



Université de Sherbrooke

**Impact de la modulation de l'expression de la protéine sécrétogranine III sur les  
fonctions analgésiques du récepteur NTS2**

Par  
Mélisange Roux  
Programme de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Juin, 2016

Membres du jury d'évaluation  
Philippe Sarret, Pharmacologie-physiologie  
Louis Gendron, Pharmacologie-physiologie  
Jean-Luc Parent, Médecine

© Mélisange Roux, 2016

## RÉSUMÉ

### Impact de la modulation de l'expression de la protéine sécrétogranine III sur les fonctions analgésiques du récepteur NTS2

Par  
Mélisange Roux  
Programme de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la famille de récepteurs membranaires la plus étendue. Présentement, 30% des médicaments disponibles sur le marché agissent sur plus ou moins 4% des RCPG connus. Cela indique qu'il existe encore une multitude de RCPG à explorer, qui pourraient démontrer un potentiel thérapeutique intéressant pour des pathologies encore sans traitement disponible. La douleur chronique, qui affecte 1 canadien sur 5, fait partie de ces affections pour lesquelles les thérapies sont faiblement efficaces. Dans le but éventuel de pallier à ce problème, le projet de ce mémoire consistait à mieux comprendre les mécanismes régissant l'adressage membranaire du récepteur de la neurotensine de type 2 (NTS2), un RCPG dont l'activation induit des effets analgésiques puissants de type non opioïdérique. Des données du laboratoire ayant révélé une interaction entre la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire de NTS2 et la sécrétogranine III (SgIII), une protéine résidente de la voie de sécrétion régulée, notre objectif était de caractériser le rôle de SgIII dans la fonctionnalité du récepteur NTS2. Pour ce faire, l'interaction entre les deux protéines a d'abord été vérifiée par co-immunoprécipitation, GST pull down, essais de colocalisation subcellulaire et par FRET. Nous avons également utilisé un outil d'interférence à l'ARN (DsiRNA) pour invalider la protéine SgIII dans un modèle cellulaire neuronal et chez l'animal. Des essais de radiolisation sur le modèle cellulaire ont révélé une diminution de l'adressage de NTS2 à la membrane plasmique lorsque SgIII était supprimée. De la même façon, une invalidation de SgIII chez le rat inhibe les effets analgésiques d'un agoniste NTS2-sélectif (JMV-431), qui sont normalement observés dans le test de retrait de la queue (douleur aiguë). Nous avons cependant identifié que des stimulations au KCl, à la capsaïcine et à la neurotensine induisaient plutôt une insertion du récepteur à la membrane dans les cellules neuronales. Puisque l'interaction entre SgIII et la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur NTS2 est peu probable selon un système de sécrétion classique, un modèle hypothétique de transition dans les corps multi-vésiculaires a été vérifié. Ainsi, la présence de NTS2 et de SgIII a été révélée dans des préparations exosomales de DRG F11, en plus d'une transférabilité du récepteur par le milieu extracellulaire. En somme, ces résultats démontrent la dépendance du récepteur NTS2 envers SgIII et la voie de sécrétion régulée, en plus d'identifier certains facteurs pouvant augmenter son expression à la surface cellulaire. Le projet contribue ainsi à ouvrir la voie vers des approches pour potentialiser les propriétés de NTS2 *in vivo*, en plus d'une piste d'explication concernant le trafic intracellulaire du récepteur. **Mots clés** : douleur, RCPG, neurotensine, NTS2, SgIII, exosomes.

# TABLE DES MATIERES

|   |             |
|---|-------------|
| <b>RÉSUMÉ .....</b>   | <b>I</b>    |
| <b>TABLE DES MATIERES .....</b>   | <b>II</b>   |
| <b>LISTE DES FIGURES.....</b>   | <b>V</b>    |
| <b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>   | <b>IX</b>   |
| <b>INTRODUCTION .....</b>   | <b>12</b>   |
| 1.1 LA DOULEUR.....   | 12          |
| 1.1.1 <i>La douleur aiguë</i> .....   | 12          |
| 1.1.2 <i>La douleur chronique</i> .....   | 14          |
| 1.2 LA NEUROTENSINE .....   | 18          |
| 1.2.1 <i>Distribution et fonctions physiologiques</i> .....                                 | 18          |
| 1.2.2 <i>Le récepteur NTS1</i> .....  | 19          |
| 1.2.3 <i>Le récepteur NTS2</i> .....  | 22          |
| 1.3 LA SÉCRÉTOGRANINE III .....   | 39          |
| 1.3.1 <i>La famille des granines</i> .....  | 39          |
| 1.3.2 <i>Rôles de la sécrétogranine III</i> .....   | 41          |
| 1.4 VOIES DE SÉCRÉTION CELLULAIRES .....  | 42          |
| 1.4.1 <i>Voie de sécrétion constitutive</i> .....   | 43          |
| 1.4.2 <i>Voie de sécrétion régulée</i> .....  | 43          |
| 1.4.3 <i>Corps multi-vésiculaires et exosomes</i> .....                                     | 45          |
| HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....   | 47          |
| <b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>  | <b>48</b>   |
| 2.1 MISE AU POINT D'UN MODÈLE <i>IN VITRO</i> POUR L'ÉTUDE DE L'INTERACTION NTS2-SgIII..... | 48          |
| 2.1.1 <i>Clonages</i> .....   | 48          |
| 2.1.2 <i>Culture cellulaire</i> .....   | 49          |
| 2.1.3 <i>Transfections</i> .....  | 49          |
| 2.2 ANALYSE DE L'INTERACTION NTS2-SgIII DANS LE MODÈLE CELLULAIRE ÉTABLI.....               | 49          |
| 2.2.1 <i>Anticorps</i> .....  | 49          |
| 2.2.2 <i>SDS-PAGE et immunobuvardage</i> .....  | 50          |
| 2.2.3 <i>GST pull down</i> .....  | 51          |
| 2.2.4 <i>FRET</i> .....   | 54          |

|       |  |            |
|-------|--|------------|
| 2.2.5 | Vérification du modèle d'interaction impliquant les corps multi-vésiculaires.....        | 57         |
| 2.2.6 | Imagerie cellulaire .....  | 58         |
| 2.3   | MODULATION DE L'INTERACTION NTS2-SgIII DANS LE MODÈLE CELLULAIRE .....                   | 59         |
| 2.3.1 | Utilisation des Dicer-substrate siRNAs .....   | 59         |
| 2.3.2 | Essais de radiolisation .....  | 62         |
| 2.3.3 | Stimulation cellulaire.....  | 64         |
| 2.4   | MODULATION DE L'INTERACTION NTS2-SgIII DANS UN MODÈLE DE DOULEUR AIGUË CHEZ LE RAT ..... | 65         |
| 2.4.1 | Le modèle de douleur aiguë chez le rat.....  | 65         |
| 2.5   | ANALYSES STATISTIQUES .....  | 68         |
| 2.5.1 | Test de Mann-Whitney.....  | 68         |
| 2.5.2 | Test de Kruskal-Wallis .....   | 68         |
| 2.5.3 | Test d'ANOVA à double voie.....  | 68         |
|       | <b>RÉSULTATS.....</b>  | <b>69</b>  |
| 3.1   | MISE AU POINT D'UN MODÈLE <i>IN VITRO</i> D'ÉTUDE DE L'INTERACTION NTS2-SgIII.....       | 69         |
| 3.1.1 | Expression endogène de la protéine SgIII dans les cellules DRG F11 .....                 | 69         |
| 3.1.2 | Expression transitoire des protéines rNTS2-YFP et 2HA-rNTS2 dans les DRG F11 .....       | 70         |
| 3.1.3 | Interaction NTS2-SgIII dans les cellules DRG F11.....                                    | 74         |
| 3.2   | MODULATION DE L'INTERACTION NTS2-SgIII DANS LE MODÈLE CELLULAIRE DRG F11 .....           | 85         |
| 3.2.1 | Invalidation génique de la protéine SgIII à l'aide des DsiRNAs .....                     | 85         |
| 3.2.2 | Impact d'une invalidation de SgIII sur l'adressage du récepteur NTS2 .....               | 86         |
| 3.2.3 | Effets de différents stimuli sur l'adressage du récepteur NTS2 .....                     | 88         |
| 3.3   | MODULATION DE L'INTERACTION NTS2-SgIII DANS LE MODÈLE DE DOULEUR AIGUË CHEZ LE RAT ..... | 92         |
| 3.3.1 | Conséquences d'une invalidation de SgIII sur les fonctions analgésiques de NTS2 .....    | 92         |
| 3.3.2 | Conséquences d'une invalidation de SgIII sur l'intégrité des voies de sécrétion .....    | 94         |
| 3.3.3 | Analyses moléculaires des tissus récoltés .....  | 95         |
|       | <b>DISCUSSION .....</b>  | <b>100</b> |
| 4.1   | INTERACTION NTS2-SgIII DANS LES CELLULES DRG F11.....                                    | 101        |
| 4.1.1 | Forces et limites du modèle.....   | 101        |
| 4.1.2 | Colocalisation subcellulaire.....  | 102        |
| 4.1.3 | GST pull down.....   | 103        |
| 4.1.4 | FRET : Transfert d'énergie par molécules fluorescentes .....                             | 104        |
| 4.1.5 | Vérification du modèle d'interaction impliquant les corps multi-vésiculaires.....        | 105        |
| 4.2   | MODULATION DE L'INTERACTION NTS2-SgIII <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> .....           | 108        |
| 4.2.1 | L'effet d'une invalidation de SgIII.....   | 108        |
| 4.2.2 | Les effets de différents stimuli sur l'adressage du récepteur NTS2 .....                 | 112        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.3 PERSPECTIVES DU PROJET.....  | 115        |
| 4.3.1 <i>Étude des corps multi-vésiculaires</i> .....                  | 115        |
| 4.3.2 <i>Induction de l'adressage de NTS2 chez l'animal</i> .....      | 116        |
| 4.3.3 <i>Le récepteur NTS2 en condition de douleur chronique</i> ..... | 117        |
| CONCLUSION .....   | 119        |
| <b>REMERCIEMENTS.....</b>  | <b>120</b> |
| <b>LISTE DES RÉFÉRENCES.....</b>                                       | <b>122</b> |

## LISTE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 : Trajet nociceptif et médication analgésique.....  | 13 |
| Figure 2 : Modifications physiologiques dans la douleur chronique.....   | 15 |
| Figure 3 : Effets physiologiques principaux de la neurotensine.....  | 19 |
| Figure 4 : Représentation des récepteurs NTS1 et NTS2 de rat .....   | 20 |
| Figure 5 : Le récepteur NTS2 et son variant d'épissage vNTS2 .....   | 23 |
| Figure 6 : Alignement des séquences de la 3 <sup>e</sup> boucle intracellulaire des récepteurs NTS2<br>humain, de rat et de souris. .... | 24 |
| Figure 7 : Colocalisation du récepteur NTS2 avec le système nociceptif. ....   | 28 |
| Figure 8 : Distribution des récepteurs NTS1 et NTS2 dans les cellules neuronales DRG F11.<br>.....                                       | 31 |
| Figure 9 : Colocalisation du récepteur rNTS2 avec des marqueurs du réseau trans-golgien et<br>de l'appareil de Golgi. ....               | 31 |
| Figure 10 : Marquage ponctiforme du récepteur NTS2 après stimulation à la NT. ....   | 32 |
| Figure 11 : Association du récepteur NTS2 à la membrane après stimulation à la NT.....   | 32 |
| Figure 12 : Persistance du récepteur NTS2 à la membrane cytoplasmique en présence<br>prolongée de neurotensine. ....                     | 34 |
| Figure 13 : Principe général du criblage double hybride chez la levure.....  | 36 |
| Figure 14 : Séquence de la 3 <sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur NTS2.....  | 37 |
| Figure 15 : Co-immunoprécipitation des protéines NTS2 et SgIII après co-transfection dans<br>les cellules HEK293.....                    | 38 |
| Figure 16 : Distribution subcellulaire et colocalisation des protéines CFPrNTS2 et<br>YFPrSgIII.....                                     | 38 |
| Figure 17 : Représentation de la protéine SgIII.....   | 39 |
| Figure 18 : Modèle de triage des prohormones induit par les granines.....  | 40 |
| Figure 19 : Voies de sécrétion cellulaires neuronales.....   | 42 |
| Figure 20 : Modèle d'adressage membranaire par les corps multi-vésiculaires.....   | 45 |
| Figure 21 : Représentation du transport et de l'exocytose des exosomes .....   | 46 |
| Figure 22 : Principe général du GST pull down. ....  | 52 |
| Figure 23 : Principe du FRET.....  | 55 |

|   |    |
|---|----|
| Figure 24 : Traitement des Dicer-substrate small interfering RNAs (DsiRNAs) dans les cellules eucaryotes. ....  | 60 |
| Figure 25 : Protocole expérimental du test de retrait de la queue.....  | 67 |
| Figure 26 : Expression endogène de SgIII dans les cellules DRG F11. ....  | 70 |
| Figure 27 : Expression transitoire des protéines rNTS2-YFP et 2HA-rNTS2 dans les DRG F11. ....  | 72 |
| Figure 28 : Liaison de la NT-I <sup>125</sup> sur les constructions du récepteur NTS2 .....   | 73 |
| Figure 29 : Colocalisation subcellulaire des protéines rNTS2-YFP et SgIII dans les cellules DRG F11.....  | 74 |
| Figure 30 : Couplage de la protéine i3(NTS2)-GST avec les billes glutathion-sépharose...  | 76 |
| Figure 31 : Essai de GST pull down avec les protéines SgIII et i3(NTS2)-GST. ....   | 77 |
| Figure 32 : Absence de liaison non-spécifique entre la protéine SgIII et les billes seules ou couplées à la GST. ....                                 | 78 |
| Figure 33 : Mesure de l'interaction des couples rNTS2-YFP/CFP et rSgIII-CFP/YFP par essai FRET.....   | 79 |
| Figure 34 : Révélation des protéines NTS2 et SgIII dans les préparations d'exosomes. ....   | 80 |
| Figure 35 : Transférabilité du récepteur NTS2 par le milieu extracellulaire. ....   | 83 |
| Figure 36 : Liaison de la NT-I <sup>125</sup> sur les exosomes de cellules exprimant le récepteur NTS2. ....  | 84 |
| Figure 37 : Invalidation de SgIII dans les cellules DRG F11 par le DsiRNA SgIII 1890....  | 86 |
| Figure 38 : Effet de l'invalidation de SgIII sur la liaison de la NT-I <sup>125</sup> . ....  | 87 |
| Figure 39 : Effet d'une dépolarisation au KCl sur la liaison de la NT-I <sup>125</sup> .....  | 89 |
| Figure 40 : Effet d'une stimulation à la capsaïcine sur la liaison de la NT-I <sup>125</sup> . ....   | 90 |
| Figure 41 : Effet d'une stimulation à la neurotensine sur la liaison de la NT-I <sup>125</sup> .....  | 91 |
| Figure 42 : Impact de l'invalidation de SgIII sur les propriétés analgésiques du JMV-431 au test de retrait de la queue. ....                         | 93 |
| Figure 43 : Impact de l'invalidation de la protéine SgIII sur les propriétés analgésiques des récepteurs opioïdes mu et δ.....                        | 95 |
| Figure 44 : Captage des DsiRNAs par les tissus cibles. ....   | 96 |
| Figure 45 : Expression de l'ARNm de SgIII et NTS2 dans la moelle épinière et les ganglions de la racine dorsale des animaux traités aux DsiRNAs. .... | 97 |



|  |    |
|--|----|
| Figure 46 : Expression protéique de SgIII dans la moelle épinière et les ganglions de la racine dorsale des animaux traités aux DsiRNAs..... | 99 |
|--|----|

## LISTE DES TABLEAUX

|   |    |
|---|----|
| Tableau 1 : Distribution des différents traitements analgésiques consommés par des patients atteints de douleur chronique. .... | 17 |
| Tableau 2 : Effets secondaires engendrés par les traitements principaux pour soulager la douleur chronique. ....                | 17 |
| Tableau 3 : Propriétés pharmacologiques d'analogues neurotensinergiques .....   | 22 |
| Tableau 4 : Seconds messagers de l'activation du récepteur NTS2. ....   | 25 |
| Tableau 5 : Amorces utilisées dans le clonage des différentes constructions .....   | 49 |
| Tableau 6 : Transfections effectuées pour l'essai FRET .....  | 56 |
| Tableau 7 : Séquences des DsiRNAs utilisés dans le projet.....  | 61 |
| Tableau 8 : Paires d'amorces utilisées pour la PCR quantitative .....   | 62 |

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

|                      |  |
|----------------------|--|
| % MPE                | <i>Maximal possible effect percentage</i>                                    |
| ADNc                 | Acide désoxyribonucléique complémentaire                                     |
| AINS                 | Anti-inflammatoire non stéroïdien  |
| ARNm                 | Acide ribonucléique messenger  |
| ATP                  | Adénosine triphosphate   |
| BCA                  | <i>Bicinchoninic acid assay</i>  |
| BSA                  | <i>Bovine serum albumin</i>  |
| CaCl <sub>2</sub>    | Chlorure de calcium  |
| CFP                  | <i>Cyan fluorescent protein</i>  |
| CgA                  | Chromogranine A  |
| CGRP                 | <i>Calcitonin gene-related peptide</i>                                       |
| CH <sub>3</sub> COOH | Acide acétique   |
| CHO                  | <i>Chinese hamster ovary cells</i>   |
| COS-7                | <i>CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material cells</i> |
| CPE                  | Carboxypeptidase E   |
| CPM                  | Coups par minute   |
| DAPI                 | 4',6'-diamidino-2-phénylindole   |
| DMEM                 | <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>                                      |
| DO <sub>595 nm</sub> | Densité optique à 595 nm   |
| DOP                  | <i>Delta (δ) opioid receptor</i>   |
| DRG                  | <i>Dorsal root ganglion</i>  |
| DsiRNA               | <i>Dicer-substrate small interfering RNA</i>                                 |
| Delt II              | Deltorphine II   |
| DTT                  | 1,4-Dithiothreitol   |
| ECL                  | <i>Enhanced chemiluminescence</i>  |
| EDTA                 | Éthylène diamine tétra-acétique  |
| FBS                  | <i>Fetal bovine serum</i>  |

|                   |   |
|-------------------|---|
| FRET              | <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>           |
| GFP               | <i>Green fluorescent protein</i>                        |
| GS4B              | Glutathion-sépharose 4B                                 |
| GMPc              | Guanosine monophosphate cyclique                        |
| GST               | Glutathion S-transférase                                |
| HA                | Hémagglutinine  |
| HCl               | Acide chlorhydrique                                     |
| HEK293            | <i>Human embryonic kidney cells</i>                     |
| HEPES             | Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique |
| HPRT              | Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase          |
| HRP               | <i>Horseradish peroxidase</i>                           |
| i3(NTS2)          | 3 <sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur NTS2 |
| IASP              | <i>International Association for the Study of Pain</i>  |
| IB                | Immunobuvardage   |
| IC <sub>50</sub>  | Concentration inhibitrice médiane                       |
| IF                | Immunofluorescence                                      |
| IPTG              | Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside                   |
| KCl               | Chlorure de potassium                                   |
| K <sub>d</sub>    | Constante de dissociation                               |
| kDa               | Kilodalton  |
| LB                | <i>Lysogeny broth</i>                                   |
| LDCV              | <i>Large dense core vesicles</i>                        |
| MAPK              | <i>Mitogen-activated protein kinases</i>                |
| MCD               | Modulation conditionnée de la douleur                   |
| MeOH              | Méthanol  |
| MgCl <sub>2</sub> | Chlorure de magnésium                                   |
| MVB               | Corps multi-vésiculaires                                |
| NaCl              | Chlorure de sodium                                      |
| NaOH              | Hydroxyde de sodium                                     |
| NO                | Oxyde nitrique  |
| NT                | Neurotensine  |

|          |  |
|----------|--|
| N-T      | Non transfectées   |
| ODC      | Ornithine décarboxylase  |
| PAG      | Substance grise périaqueducule                                   |
| pb       | Paires de bases  |
| PC12     | <i>Pheochromocytoma of the rat adrenal medulla cells</i>         |
| PFA      | Paraformaldéhyde   |
| PVDF     | Polyfluorure de vinylidène                                       |
| qPCR     | <i>Quantitative polymerase chain reaction</i>                    |
| RCPG     | Récepteur couplé aux protéines G                                 |
| RIPA     | <i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>                     |
| RISC     | <i>RNA-induced silencing complex</i>                             |
| RVM      | Région bulbaire rostro-ventrale                                  |
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| SEM      | <i>Standard error of the mean</i>                                |
| SgIII    | Sécrétogranine III   |
| siRNA    | <i>Small interfering RNA</i>                                     |
| TBS/PBS  | <i>Tris- / Phosphate- buffered saline</i>                        |
| TGN      | <i>Trans-Golgi network</i>                                       |
| TSG101   | <i>Tumor susceptibility gene 101</i>                             |
| VIH      | Virus de l'immunodéficience humaine                              |
| vNTS2    | Variant NTS2   |
| VTA      | Aire tegmentale ventrale   |
| YFP      | <i>Yellow fluorescent protein</i>                                |

# INTRODUCTION

## 1.1 La douleur

La douleur est un état complexe défini par l'Association internationale d'étude de la douleur (IASP) comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles, ou décrites en des termes évoquant de telles lésions (Loeser & Melzack, 1999). Afin de différencier la forme physiologique de l'état pathologique de la douleur, celle-ci est divisée en deux catégories majeures : la douleur aiguë et la douleur chronique.

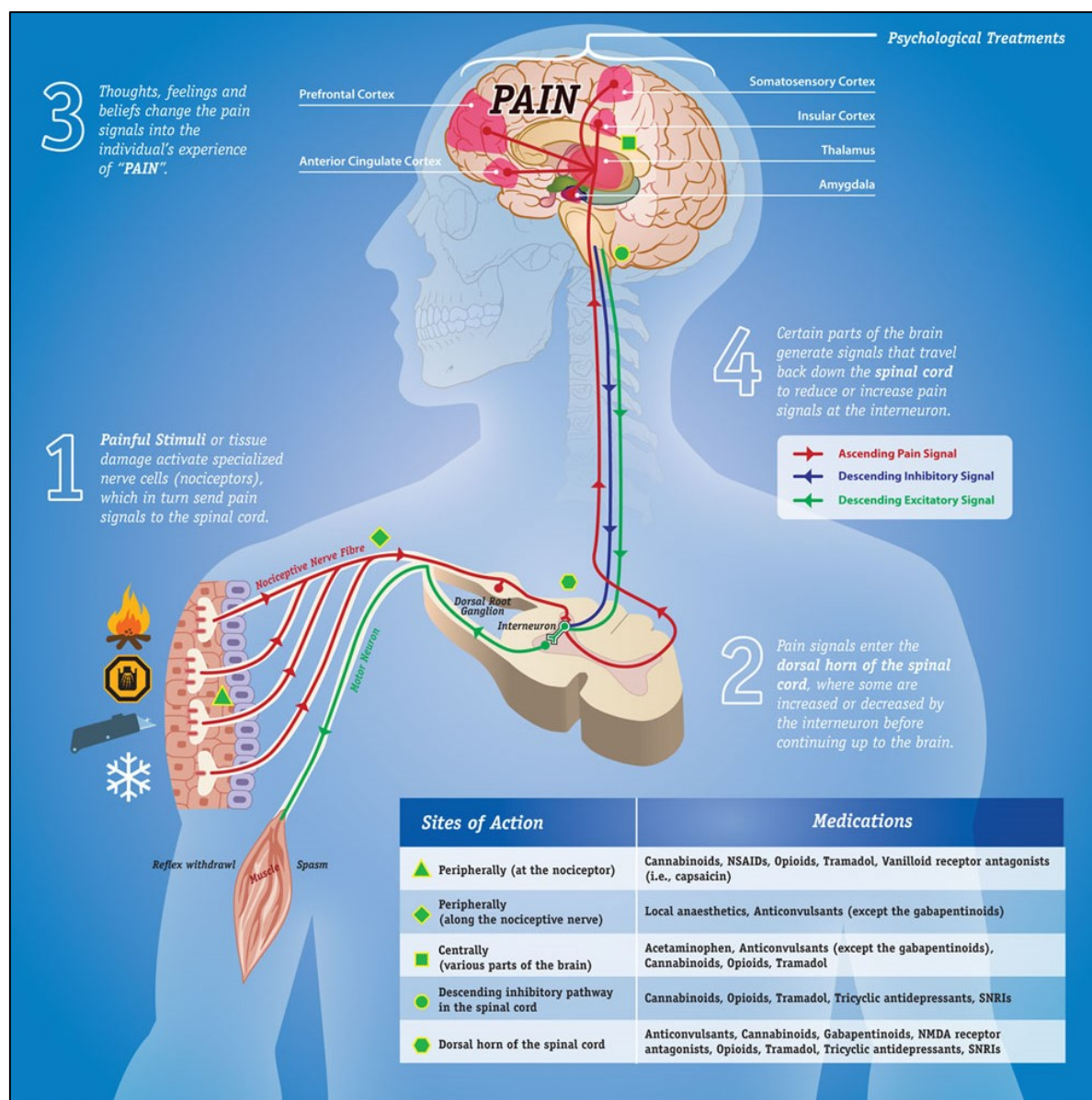
### 1.1.1 La douleur aiguë

La douleur aiguë est un phénomène naturel qui a pour but de protéger l'homme de son environnement et de dommages physiques potentiels (Loeser & Melzack, 1999). C'est une douleur généralement brève et qui s'efface lorsque les atteintes tissulaires l'ayant causée guérissent.

La grande majorité des êtres vivants possède un système de transducteurs spécialisés, les nocicepteurs, qui permettent de mettre en branle le processus d'alerte biologique qu'est la douleur. La nociception est donc définie comme étant la détection d'un dommage tissulaire par ces nocicepteurs (Figure 1) (Julius & Basbaum, 2001; Loeser & Melzack, 1999). Le stimulus peut être de nature thermique, mécanique ou chimique. En absence de pathologie, les fibres sensorielles A $\delta$  et C sont responsables de capter ces stimuli nociceptifs et de transporter le message de la périphérie à la moelle épinière, où elles font synapse avec des neurones de 2<sup>e</sup> ordre situés dans la corne dorsale, principalement au niveau des laminae superficielles (I-II) (Beaulieu *et al.*, 2005; D'Mello & Dickenson, 2008).

Les neurones de 2<sup>e</sup> ordre empruntent ensuite les voies ascendantes jusqu'aux centres supérieurs, où il y aura relais avec des neurones projetant vers différentes régions du cortex cérébral. C'est alors qu'est perçue et intégrée la douleur ainsi que les aspects émotionnels qui l'accompagnent. Enfin, une activation du système descendant monoaminergique peut moduler la douleur de façon facilitatrice ou inhibitrice en allant à l'encontre de l'influx nociceptif (Calvino, 2006).

Lorsque des perturbations surviennent à différents niveaux du système de la transmission nociceptive, la douleur peut se chroniciser et prendre ainsi une forme pathologique.



**Figure 1 : Trajet nociceptif et médication analgésique.** Le stimulus douloureux transite de la périphérie (1) vers la moelle épinière (2). Il emprunte ensuite les voies ascendantes jusqu'aux centres supérieurs (3), où il peut activer les voies descendantes de modulation de la douleur (4). Les thérapies analgésiques actuelles peuvent intervenir à différents points du trajet nociceptif. Image libre de droits produite par PainExplained.ca, prise sur <http://www.optimyz.com/pain-explained/>. Prendre note que le site Internet PainExplained.ca n'est plus fonctionnel.

### ***1.1.2 La douleur chronique***

Il est très difficile d'identifier le moment où la douleur passe de l'état aigu à chronique. Selon l'IASP, la douleur chronique est définie comme une douleur sans valeur biologique apparente et qui persiste au-delà du temps de guérison normal (Larner, 2013). Qu'entend-on par un temps de guérison « normal » ? Selon le Bonica's Management of Pain, le point de division entre la douleur aiguë et la douleur chronique se situerait de 3 à 6 mois après le début de la douleur (Fishman *et al.*, 2010). Bien que cette définition dans le temps soit encore controversée, il est connu que la douleur chronique survient suite à des événements de plasticité neuronale qui peuvent avoir lieu à différents niveaux du circuit nociceptif.

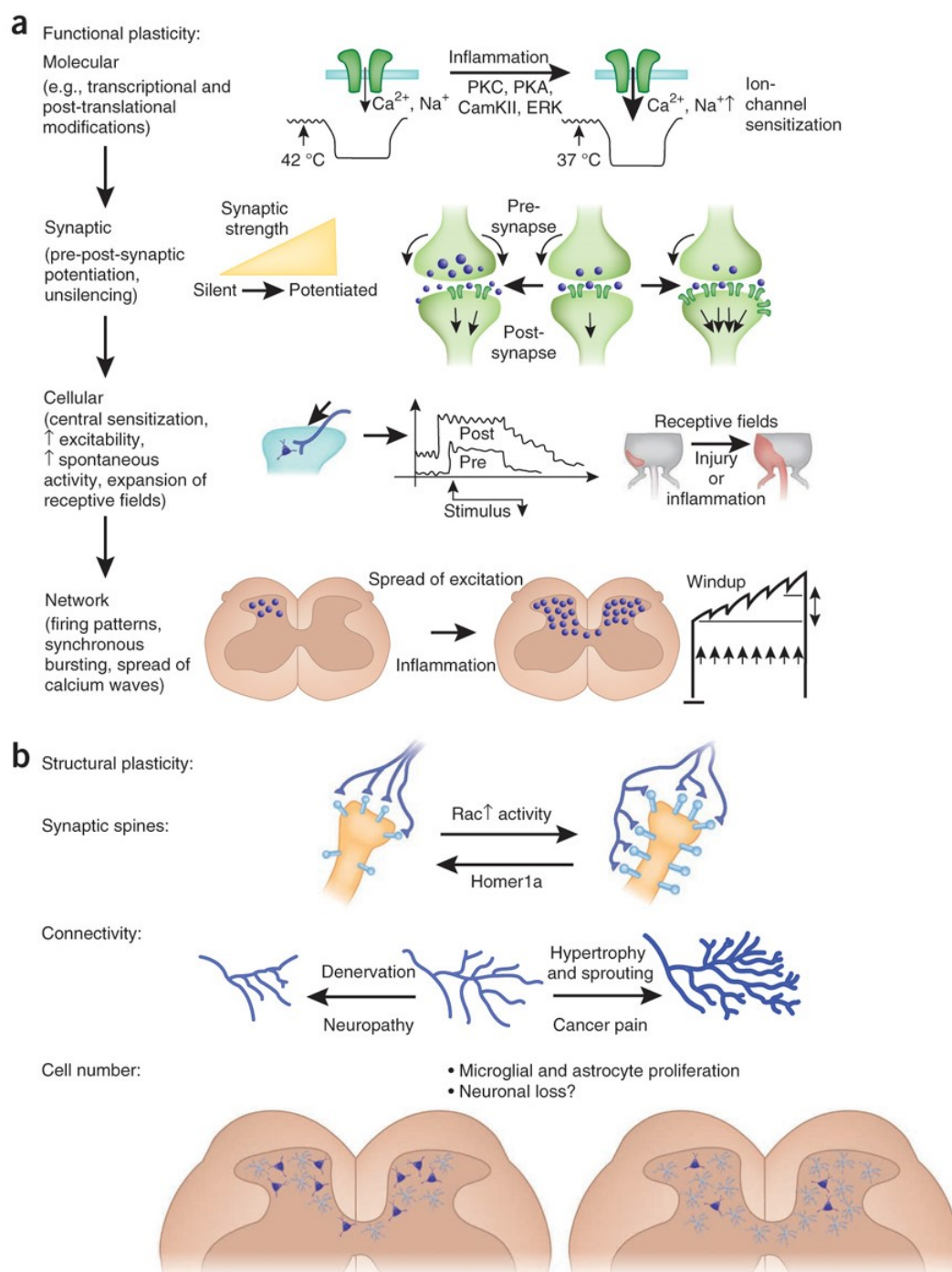
#### ***1.1.2.1 Mécanismes de mise en place de la douleur chronique***

Le phénomène de neuroplasticité le mieux décrit dans la littérature pour expliquer l'installation d'une douleur chronique est la sensibilisation périphérique et/ou centrale.

La sensibilisation périphérique s'observe lors d'un dommage tissulaire où plusieurs médiateurs inflammatoires sont recrutés (substance P, neurokinine A, CGRP, cytokines, etc.). Cette « soupe » inflammatoire sensibilise les nocicepteurs en abaissant leur seuil de dépolarisation, ce qui entraîne une hausse de la réponse nociceptive au site de la blessure (Fishman *et al.*, 2010). Ce phénomène, appelé hyperalgésie primaire, peut notamment se percevoir en présence d'une blessure mineure, alors que le site lésé devient plus sensible au toucher ou aux variations de température. Lorsque l'inflammation périphérique n'est pas bien contrôlée, la stimulation constante provenant des afférences primaires entraîne une hyperexcitabilité des neurones centraux, ce qu'on identifie comme la sensibilisation centrale (Puretić & Demarin, 2012). Les neurones centraux peuvent alors subir des changements physiologiques à long terme (Figure 2) et perdre leur capacité à filtrer l'information nociceptive. Cela peut engendrer une interprétation excessive du signal, appelée hyperalgésie secondaire, ou une traduction erronée d'un stimulus non-nocif en message douloureux, définie comme étant de l'allodynie (Meyr & Saffran, 2008).

Certaines évidences pointent également vers un déficit des mécanismes endogènes d'inhibition de la douleur (MCD) pour expliquer le développement de la douleur chronique (Chalaye *et al.*, 2012; Julien *et al.*, 2005). Bien qu'observé dans plusieurs conditions pathologiques, comme la fibromyalgie et le syndrome du côlon irritable, il n'est pas connu si ce phénomène est à l'origine de la pathologie ou bien résulte de celle-ci.





**Figure 2 : Modifications physiologiques dans la douleur chronique.** Les cellules du système nerveux surexposées à un stimulus nociceptif peuvent subir des phénomènes de plasticité fonctionnelle ou structurelle. (Kuner, 2010). Reproduit avec permission.

Les facteurs prédisposant un individu à développer de la douleur chronique sont encore méconnus des scientifiques. Nous savons cependant que la douleur chronique est une pathologie extrêmement débilatante qui engendre des coûts exorbitants du point de vue socio-économique.

#### *1.1.2.2 Prévalence et impact socio-économique de la douleur chronique*

D'après plusieurs études, 1 adulte canadien sur 5 souffre aujourd'hui de douleur chronique et la prévalence augmente avec l'âge (Lavis & Boyko, 2009; Moulin *et al.*, 2002; Schopflocher *et al.*, 2011). Au niveau économique, la douleur chronique coûte plus cher que le cancer, les maladies cardiaques et le VIH combinés, soit près de 6 milliards de dollars canadiens par année en soins de santé et 37 milliards en frais associés à la perte de productivité, soit par la perte d'emploi ou l'absentéisme au travail (Phillips & Schopflocher, 2008). En plus d'être particulièrement accablante socialement, la douleur chronique entraîne plusieurs comorbidités, comme des troubles d'anxiété, la dépression et des risques de suicide doublés par-rapport à la population saine (Bandelow, 2015; Gureje *et al.*, 1998; Tang & Crane, 2006).

#### *1.1.2.3 Traitements actuels de la douleur chronique*

Selon la sévérité de la douleur diagnostiquée par le professionnel de la santé, les principaux traitements pharmacologiques prescrits pour soulager la douleur chronique sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), certains antidépresseurs tricycliques, des anticonvulsivants et les opioïdes, dont la morphine qui demeure l'étalon d'or en termes de potentiel analgésique (Tableau 1) (Lynch et Watson, 2006). Cependant, la plupart de ces médications sont recommandées pour un soulagement à court terme seulement, car elles entraînent des effets secondaires importants (Tableau 2) (Häuser *et al.* 2014; Lynch & Watson, 2006; Ussai *et al.* 2015). Ainsi, une proportion non négligeable de patients atteints de douleur chronique doit vivre quotidiennement avec des effets secondaires indésirables ou est même réfractaire aux thérapies disponibles (Bjordal *et al.* 2007; de la Calle Gil *et al.*, 2015; Parkoohi *et al.*, 2015). Afin d'améliorer la qualité de vie de ces patients, il est nécessaire d'investiguer de nouvelles avenues thérapeutiques qui permettraient de soulager efficacement la douleur chronique tout en limitant les effets secondaires.

**Tableau 1 : Distribution des différents traitements analgésiques consommés par des patients atteints de douleur chronique.**

| Pharmacothérapie                            | Canada<br>(2002) % | Europe<br>(2006) % | État du Kansas, USA<br>(2011) % |
|---|--------------------|--------------------|---------------------------------|
| AINS conventionnels                         | 40,2               | 44                 | 34,5                            |
| Inhibiteurs de COX-2                        | 25,9 <sup>1</sup>  | 6                  | 8,8                             |
| Opioïdes                                    | 22,2               | 28                 | 45,7                            |
| Autres analgésiques<br>(Ex. acétaminophène) | ND                 | 18                 | 9,7                             |
| Antidépresseurs                             | 6,2                | 3                  | ND                              |
| Anticonvulsivants                           | 5                  | 2                  | ND                              |
| Autres                                      | 15,3               | 10                 | 16,8                            |

Tableau adapté des résultats obtenus lors de sondages téléphoniques auprès de 340 répondants canadiens (Moulin *et al.*, 2002), 46 394 répondants européens (Breivik *et al.*, 2006) et 4090 répondants américains (Toblin *et al.*, 2011) atteints de douleur chronique. Les totaux peuvent dépasser 100% dû aux cas de prescriptions multiples. ND : information non disponible.

**Tableau 2 : Effets secondaires engendrés par les traitements principaux pour soulager la douleur chronique.**

| AINS  | Opioïdes                                      |
|---|---|
| Troubles digestifs fréquents (ulcères)        | Troubles digestifs fréquents (constipation)   |
| Troubles neuropsychiques                      | Troubles neuropsychiques                      |
| Insuffisance rénale                           | Convulsions                                   |
| Rétention hydrique                            | Troubles mictionnels                          |
| Fibrillation auriculaire                      | Myosis  |
| Saignements                                   | Transpirations                                |
| Thrombose artérielle et infarctus du myocarde | Dépendance avec syndrome de sevrage           |
| Atteintes cutanées                            | Baisse de la libido et troubles de l'érection |
| Aggravation d'infections                      | Bradycardies, tachycardies, palpitations      |
| Rares atteintes hépatiques, pancréatites      | Hypothermie                                   |
| Rares méningites aseptiques                   | Somnolence, ataxie                            |
| Atteintes hématologiques                      | Urticaire et prurit                           |
| Cystites                                      | Hausse de la pression intracrânienne          |
| Diminution de la fertilité                    | Allongement de l'intervalle QT                |
| Syndrome de Reye                              | Hypoglycémie                                  |

D'après le Petit manuel de Pharmacovigilance et Pharmacologie clinique (Revue Prescrire, 2011).

<sup>1</sup> La forte diminution de la prescription des inhibiteurs de COX-2 entre les études de 2002 et 2006 pourrait s'expliquer par la publication de résultats démontrant la relation entre cette classe d'analgésiques et les risques d'accidents cardiovasculaires (Mukherjee *et al.*, 2001). Cela a notamment mené à un scandale entourant la commercialisation du Vioxx, puissant inhibiteur de COX-2, ainsi que la fin de sa mise en marché en 2004 (Delépine, 2011).

## 1.2 La neurotensine

En 1973, Carraway et Leeman purifient la neurotensine (NT) à partir d'hypothalami bovins sur la base de sa capacité à induire une hypotension chez le rat. Au niveau cellulaire, le neuropeptide de 13 acides aminés est synthétisé à partir du précurseur de la pro-neurotensine et est sécrété de façon régulée par l'entremise des vésicules à corps dense (Dobner *et al.*, 1987; Kitabgi, 2006). La NT ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique en plus d'être rapidement dégradée par des protéases lorsque administrée de façon systémique (Tyler-McMahon *et al.*, 2000). Le plus court fragment actif fait 6 acides aminés et comprend les résidus de 8 à 13 (*p*-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH) (Furuta *et al.*, 1984). C'est également un peptide retrouvé dans la majorité des espèces et dont la portion C-terminale est hautement conservée (Carraway *et al.*, 1982).

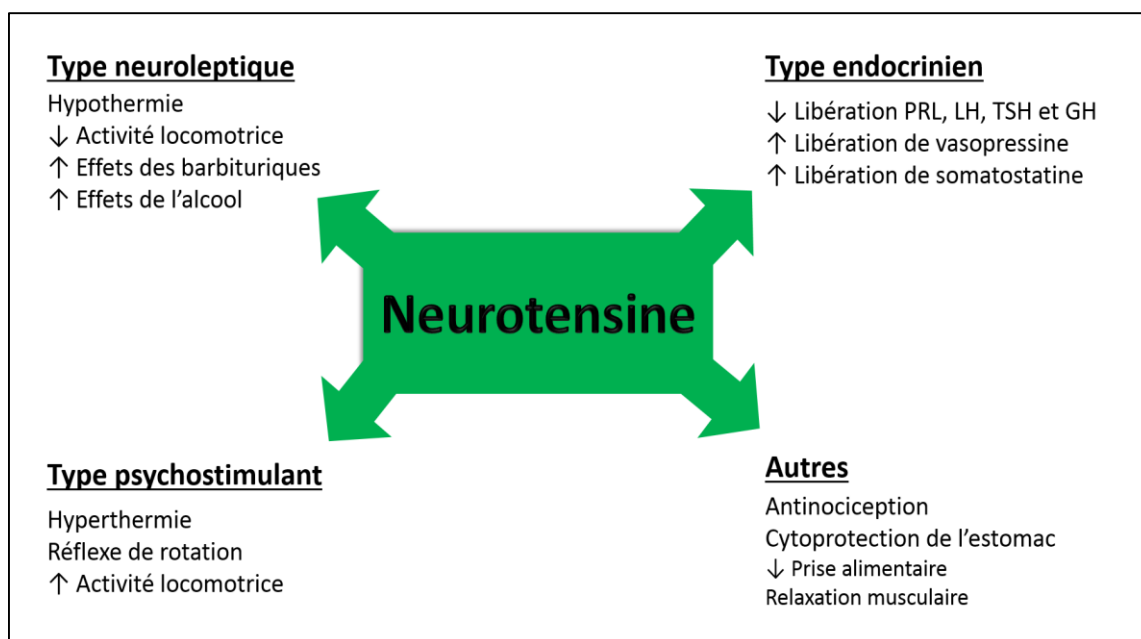
### 1.2.1 Distribution et fonctions physiologiques

La neurotensine est largement distribuée au niveau de l'organisme et exerce une multitude de fonctions qui ne seront pas approfondies dans ce mémoire. Elle se retrouve principalement dans le système cardio-vasculaire, le tractus gastro-intestinal et le système nerveux central (Mai *et al.*, 1987; Reinecke, 1985; Vincent *et al.*, 1999).

Au niveau du système nerveux central, la NT est distribuée, entre autres, dans les aires impliquées dans le contrôle cardio-vasculaire, la thermorégulation et le contrôle de la douleur (Benmoussa *et al.*, 1996; Dobner, 2006; Osadchii, 2015). Elle est effectivement connue pour induire une forte hypotension, une hypothermie ainsi que de l'analgésie lorsqu'injectée au cerveau et dans la moelle épinière (Prange *et al.*, 1982). De plus, une injection centrale de NT chez le rongeur induit des effets de type neuroleptique ou psychostimulant selon la dose, en plus d'influencer le système endocrinien (Figure 3) (Rostène & Alexander, 1997; Zsürger, 2001).

Parmi les multiples actions de la NT, nous nous intéressons donc particulièrement à ses propriétés antinociceptives, caractérisées pour la première fois par Clineschmidt et McGuffin en 1977 suite à l'injection intracisternale du peptide chez la souris. Les souris traitées ont ainsi démontré une diminution des comportements douloureux dans des modèles de douleur thermique et viscérale (test de la plaque chaude et test des crampes abdominales). En 1979, les mêmes auteurs utilisent le naloxone, un antagoniste des récepteurs opioïdes, pour

démontrer que l'analgésie induite par la neurotensine est indépendante du système opioïdérique.



**Figure 3 : Effets physiologiques principaux de la neurotensine.** D'après Zsürger, 2011.

À ce jour, trois récepteurs de la neurotensine ont été caractérisés. Les deux premiers, NTS1 et NTS2, appartiennent à la famille des RCPG et ont été clonés chez l'humain, le rat et la souris (Chalon *et al.*, 1996; Mazella *et al.*, 1996, Tanaka *et al.*, 1990; Vita *et al.*, 1993; Vita *et al.*, 1998). Le troisième récepteur, NTS3, possède un seul domaine transmembranaire et est identique à la protéine gp95/Sortiline (Mazella *et al.*, 1998; Mazella *et al.*, 2006). Pour ce mémoire, nous aborderons uniquement les récepteurs connus pour engendrer les effets physiologiques de la neurotensine, soit NTS1 et NTS2 (Labbé-Jullié *et al.*, 1994).

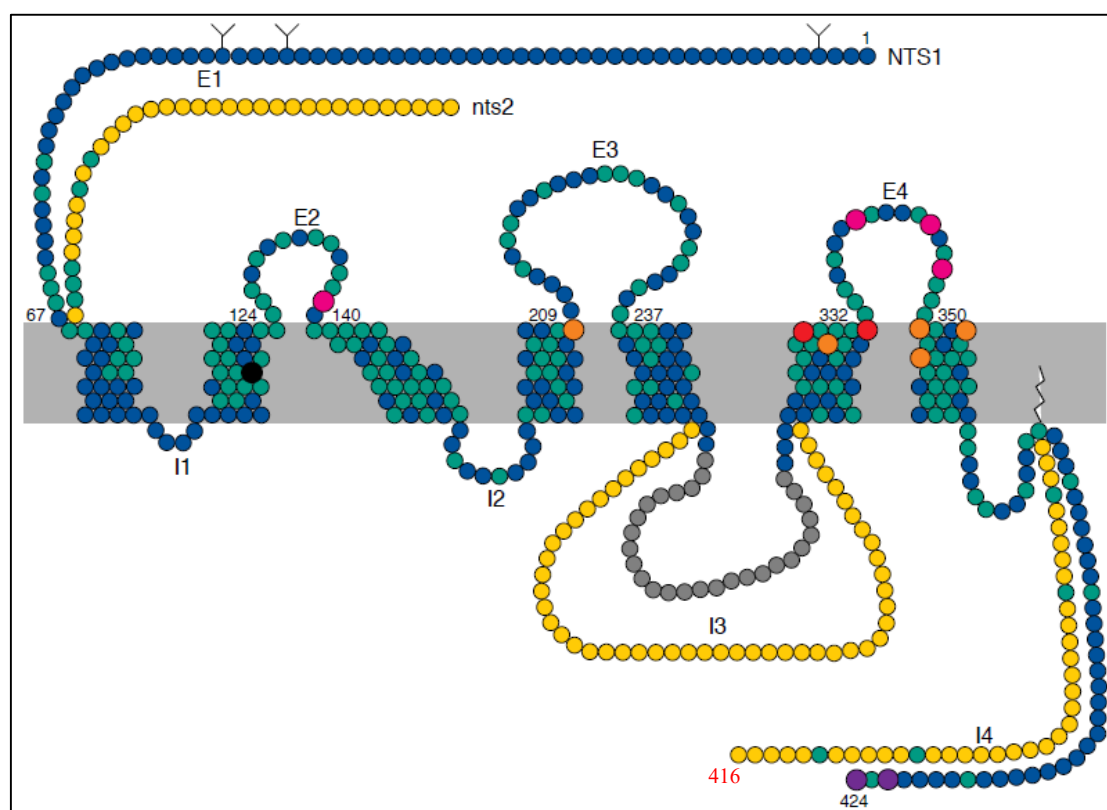
## 1.2.2 Le récepteur NTS1

### 1.2.2.1 Caractéristiques générales

Le récepteur NTS1 est un récepteur couplé aux protéines G de haute affinité pour la neurotensine ( $K_d = 0,1 - 0,3$  nM). La protéine fait 418 acides aminés et possède une masse apparente de 50-60 kDa (Figure 4). Son ARN messager a été retrouvé principalement au cerveau et dans les intestins, autant chez le rat que chez l'humain (Vincent *et al.*, 1999).

Dans plusieurs types cellulaires, l'activation du récepteur NTS1 induit la production d'inositol phosphate (IP), suivie d'une élévation du calcium intracellulaire, qui a été attribuée au couplage à la protéine  $G_{q/11}$  (Amar *et al.*, 1986; Turner *et al.*, 1990). On observe ensuite une production de GMPc dépendante de la présence de l'oxyde nitrique synthase et de la formation de NO, un puissant vasodilatateur (Slusher *et al.*, 1994). Le récepteur va également activer ou inhiber l'adénylate cyclase par une interaction avec  $G_{i/o}$  ou  $G_s$ , selon la lignée cellulaire dans laquelle il est exprimé (Pelaprat, 2006).

Suite à son activation, le récepteur sera rapidement internalisé puis dégradé par les enzymes lysosomales (Mazella & Vincent, 2006).



**Figure 4 : Représentation des récepteurs NTS1 et NTS2 de rat.** Le récepteur NTS1 (bleu) et NTS2 (jaune) possèdent une homologie de 64% (résidus en vert). Les résidus importants pour la liaison de la NT et du SR48692 sur le récepteur NTS1 sont en rose et orange respectivement, alors que les résidus en rouge interviennent dans la liaison aux deux composés. Les acides aminés Thr422 et Tyr424 (violet) sont primordiaux pour l'internalisation de NTS1, et l'Asp113 (noir) permet la liaison au Na<sup>+</sup>. Le couplage à la protéine G<sub>q</sub> se fait au niveau de la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire de NTS1 (gris) et le récepteur peut être glycosylé sur sa portion N-terminale (Y). Les nombres en noir concernent seulement les résidus du récepteur NTS1, alors que le nombre en rouge représente la longueur du récepteur NTS2 (Vincent *et al.*, 1999). Reproduit avec permission.

### 1.2.2.2 Propriétés physiologiques

Le partage des effets physiologiques attribuables à la NT entre les récepteurs NTS1 et NTS2 a fait l'objet de plusieurs publications et controverses. Ainsi, une première lignée de souris déficiente pour le gène NTS1 s'est montrée insensible à la neurotensine en termes d'hypothermie, d'analgésie et de relaxation de l'iléon (Pettibone *et al.*, 2002). La même année, un autre groupe obtient des résultats différents avec leur lignée de souris déficiente pour le gène NTS1, et conclut plutôt que le récepteur ne serait pas impliqué dans l'analgésie induite par la NT (Remaury *et al.*, 2002). Les deux équipes s'entendent cependant sur l'association entre l'activation du récepteur NTS1 et les effets hypothermiques de la NT. D'ailleurs, l'injection d'un analogue neurotensinergique non-sélectif, le NT69L par exemple, induit une hypothermie et une hypotension soutenues chez l'animal (Tableau 3) (Fantegrossi *et al.*, 2005; Popp *et al.*, 2007; Tyler *et al.*, 1999), et ces phénomènes sont toujours fortement présents lorsque c'est un agoniste NTS1-sélectif qui est administré, comme le PD149163 (Feifel *et al.*, 2010; Wustrow *et al.*, 1995). De plus, l'utilisation de la molécule SR48692, un antagoniste du récepteur NTS1, a permis de montrer que ce récepteur était responsable des mouvements rotatoires ainsi que de l'hypomotilité gastro-intestinale associés à l'injection centrale de NT (Dubuc *et al.*, 1994; Gully *et al.*, 1993).

Par rapport aux propriétés analgésiques, plusieurs auteurs ont finalement démontré les effets analgésiques du PD149163 chez le rongeur dans des modèles de douleur aiguë (test de retrait de la queue), de douleur tonique (test de formaline et test des crampes abdominales) et même dans un modèle chronique de douleur neuropathique (Buhler *et al.*, 2005; Guillemette *et al.*, 2012; Roussy *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2012). Dans tous les cas, les effets du PD149163 étaient efficacement antagonisés par le SR48692 ou par une stratégie d'invalidation génique du récepteur NTS1.

**Tableau 3 : Propriétés pharmacologiques d'analogues neurotensinergiques**

| Analogues             | Séquences  | hNTS1<br>IC <sub>50</sub><br>(nM) | hNTS2<br>IC <sub>50</sub><br>(nM) | Sélectivité | Analgésie | Hypothermie/<br>hypotension |
|-----------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------|-----------|-----------------------------|
| <b>NT</b>             | pyroGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn- Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr- Ile-Leu-OH | 0.3                               | 3                                 | 10          | +         | +                           |
| <b>PD149163</b>       | Lys-(psiCH <sub>2</sub> NH)-Lys-Pro-Trp-Terleu-Leu-OEt       | 100                               | >10 000                           | >100        | +         | +                           |
| <b>JMV-431</b>        | Boc-Arg-Arg-Pro-Tyr-psi(CH <sub>2</sub> NH)Ile-Leu           | 3315                              | 38                                | 88          | +         | -                           |
| <b>NT79</b>           | [N-methyl-Arg8, D-3,1-Nal11,tert-Leu12]NT(8-13)              | 2100                              | 10                                | 210         | +         | -                           |
| <b>NT69L</b>          | [N-ethyl-Arg8,L-Lys9,L-neo-Trp11,tert-Leu12]NT(8-13)         | 3.1                               | 2.1                               | 0.7         | +         | +                           |
| <b>Levo-cabastine</b> | Non peptidique   | >10 000                           | 2.7                               | >100        | +/-       | -                           |

Séquence, affinité, sélectivité et propriétés physiologiques de différents analogues neurotensinergiques. Selon, Petrie *et al.*, 2004 (PD149163), Boules *et al.*, 2010 (NT69L et NT79), Vita *et al.*, 1998 (Levocabastine) et les données récoltées au laboratoire de P. Sarret (NT et JMV-431).

Tel que mentionné précédemment, les effets physiologiques de la neurotensine seraient indépendants du système opioïdérique. L'inverse a cependant été vérifié dans une lignée de souris déficiente pour le récepteur NTS1, chez laquelle la réponse analgésique à un agoniste mu opioïde s'est révélée altérée par-rapport à la lignée sauvage (Roussy *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent une implication du système neurotensinergique en aval de l'activation opioïde, ce qui renforce l'intérêt de notre étude à des fins de thérapie analgésique individuelle ou combinée aux traitements morphiniques.

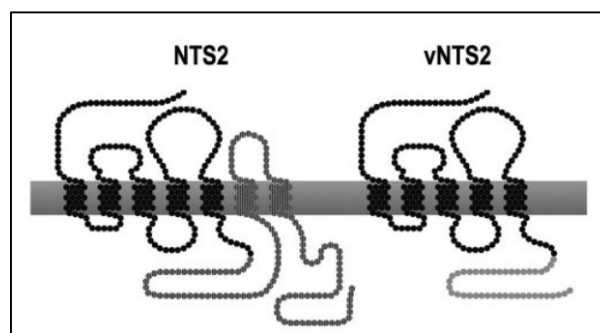
### 1.2.3 Le récepteur NTS2

#### 1.2.3.1 Caractéristiques générales

Le récepteur NTS2 murin est un RCPG de 416 acides aminés et de 46 KDa possédant une affinité pour la neurotensine inférieure au NTS1, soit de 2-4 nM (Figure 4) (Vincent *et al.*, 1999). Il détient cependant la particularité de lier la lévocabastine, un antihistaminique, avec une affinité semblable. Ce deuxième ligand présente des caractéristiques d'agoniste partiel, en étant apte à bloquer la liaison de la neurotensine, tout en induisant une analgésie nettement moins robuste (Dubuc *et al.*, 1999b).



Lors de la transcription du gène du récepteur NTS2, un épissage alternatif peut mener à l'expression d'un variant tronqué, vNTS2, constitué uniquement des 5 premières régions transmembranaires du récepteur et d'une séquence en acides aminés alternative à partir du 240<sup>e</sup> résidu, correspondant à la portion C-terminale du variant (Figure 5) (Botto *et al.*, 1997a; Perron *et al.*, 2005). Quoique faiblement adressé à la membrane cellulaire, le variant NTS2 de rat conserve la capacité de lier la neurotensine (IC<sub>50</sub> de 10 µM) et de signaler via la voie des MAPK (Perron *et al.*, 2005). Dans le cerveau de rat, le variant est co-exprimé avec la forme complète de NTS2 et retrouvé exclusivement sous conformation dimérique, soit avec lui-même ou avec le récepteur à 7 domaines transmembranaires. Cette particularité pourrait lui conférer un rôle modulateur dans la réponse à la neurotensine au niveau du système nerveux central (Perron *et al.*, 2005).

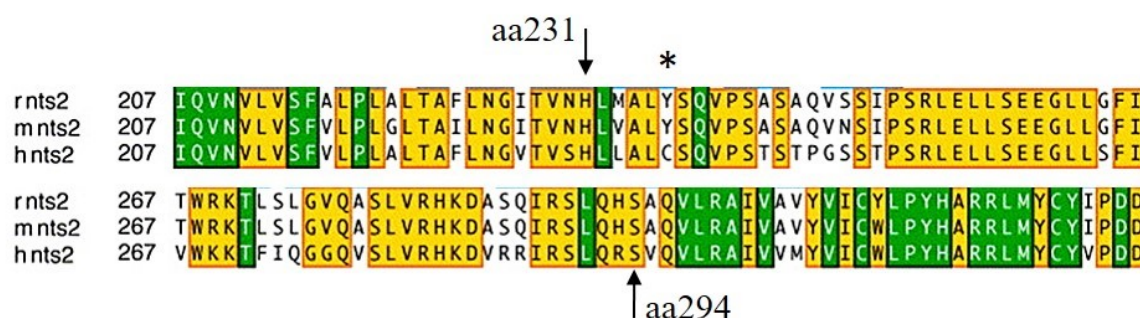


**Figure 5 : Le récepteur NTS2 et son variant d'épissage vNTS2.** Le variant d'épissage alternatif vNTS2 résulte d'une délétion de 181 paires de base menant à l'introduction précoce d'un codon stop avant la région codant pour le 6<sup>e</sup> domaine transmembranaire. Les séquences identiques sont représentées en noir, alors que les résidus qui diffèrent entre le récepteur NTS2 et son variant sont identifiés en gris (Perron *et al.*, 2005). Reproduit avec permission.

Les mécanismes de transmission du signal du récepteur NTS2 demeurent encore aujourd'hui très controversés. La première réponse enregistrée fut obtenue dans l'oocyte de *Xenopus*, où l'activation du récepteur de souris induisait la production d'un courant chlore calcium-dépendant (Botto *et al.*, 1997b). Par la suite, plusieurs équipes différentes ont enregistré des réponses contradictoires selon l'espèce et le type cellulaire dans lequel il était exprimé (Tableau 4) (Mazella & Vincent, 2006). Ces résultats peuvent notamment s'expliquer par l'utilisation de systèmes hétérologues en surexpression du récepteur, ce qui s'éloigne de l'environnement endogène où NTS2 est plutôt faiblement exprimé. Pour se rapprocher de cette réalité, Sarret et collaborateurs ont étudié le récepteur sur des cellules

granulaires du cervelet de rat préparées en culture primaire. L'équipe a ainsi démontré une absence de mobilisation du calcium et de production d'inositol phosphate. Cependant, l'activation du récepteur engendre une phosphorylation soutenue des MAPK p42/p44 dans leur système d'expression endogène (Sarret *et al.*, 2002). Ces résultats seront ensuite corroborés à l'aide de cellules CHO transfectées avec le récepteur NTS2 de rat, où on note toujours une absence de mobilisation calcique, mais une activation des kinases p42/p44 dépendante de l'internalisation du récepteur (Gendron *et al.*, 2004).

Contrairement au récepteur NTS1, le récepteur NTS2 murin est recyclé à la membrane suite à son internalisation (Mazella & Vincent, 2006). D'ailleurs, ce recyclage serait dépendant d'un seul acide aminé situé dans la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire, la tyrosine 237, dont la phosphorylation confère la capacité au récepteur NTS2 de souris d'éviter la dégradation (Figure 6) (Martin *et al.*, 2002). De façon intéressante, la mutation de la cystéine 237 en tyrosine chez le récepteur d'espèce humaine permet d'obtenir un recyclage membranaire, alors que celui-ci est normalement dégradé suite à son internalisation. Le récepteur NTS2 de rat possède également cette tyrosine en position 237, ce qui laisse supposer qu'il soit recyclé à la membrane après internalisation.



**Figure 6 : Alignement des séquences de la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire des récepteurs NTS2 humain, de rat et de souris.** La 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire commence au résidu 231 et se termine au résidu 294, identifiés par les flèches. L'astérisque détermine l'emplacement du 237<sup>e</sup> acide aminé, occupé par une tyrosine (Y) chez le rat (r) et la souris (m), et par une cystéine (C) chez l'humain (h). Les boîtes jaunes représentent les séquences conservées entre les trois espèces pour le récepteur NTS2, alors que les boîtes vertes indiquent les acides aminés qui sont également conservés avec le récepteur NTS1 humain, de rat et de souris. Adaptation de Vincent *et al.*, 1999 effectuée avec permission.

**Tableau 4 : Seconds messagers de l'activation du récepteur NTS2.**

| Origine du récepteur  | Système d'expression  | Augmentation du $\text{Ca}^{2+}$ cytosolique                | Activation des MAPK   | Formation d'IP  |
|---|---|---|---|---|
| <b>Souris</b>   | <i>Xenopus</i> oocyte<br>(Botto <i>et al.</i> , 1997b)                                | NT (+)<br>Levocabastine (+)<br>SR48692 (+)                  | ND  | ND  |
|   | Cellules HEK293<br>(lignée stable)<br>(Botto <i>et al.</i> , 1998)                    | ND  | ND  | NT (0)<br>Levocabastine (0)                                 |
| <b>Rat</b>  | Cellules CHO<br>(lignée stable)<br>(Yamada <i>et al.</i> , 1998)                      | JMV449 (+)<br>NT (+)<br>Levocabastine (+)<br>SR48692 (+)    | ND  | ND  |
|   | Cellules CHO<br>(lignée stable)<br>(Gendron <i>et al.</i> , 2004)                     | NT (0)<br>Levocabastine (0)<br>SR48692 (0)                  | NT (+)<br>Levocabastine (+)<br>SR48692 (+)                  | ND  |
|   | Culture primaire cellules<br>granulaires du cervelet<br>(Sarret <i>et al.</i> , 2002) | NT (0)<br>Levocabastine (0)<br>SR48692 (+)                  | NT (+)<br>Levocabastine (+)<br>SR48692 (0)                  | NT (0)<br>Levocabastine (0)<br>SR48692                      |
| <b>Humain</b>   | Cellules CHO<br>(lignée stable)<br>(Vita <i>et al.</i> , 1998)                        | NT (-)<br>Levocabastine (-)<br>SR48692 (+)<br>SR142948A (+) | NT (-)<br>Levocabastine (-)<br>SR48692 (+)<br>SR142948A (+) | NT (-)<br>Levocabastine (-)<br>SR48692 (+)<br>SR142948A (+) |
|   | Cellules CHO<br>(lignée stable)<br>(Gendron <i>et al.</i> , 2004)                     | ND  | NT (+)<br>Levocabastine (+)<br>SR48692 (+)                  | ND  |
|   | Cellules COS<br>(transfection transitoire)<br>(Richard <i>et al.</i> , 2001)          | ND  | ND  | Levocabastine (-)<br>NT (*)<br>SR48692 (+)<br>JMV-431 (*)   |
| (+) : activité agoniste, (-) : activité antagoniste, (0) : aucun effet, (*) activité agoniste inverse,<br>ND : non déterminée |   |   |   |   |

La signalisation suivant l'activation du récepteur NTS2 dépend fortement du système d'expression, de l'espèce du récepteur et du ligand utilisé (Selon Mazella & Vincent, 2006).

### 1.2.3.2 Distribution

L'ARN messenger du récepteur NTS2 a été démontré comme étant largement distribué au système nerveux central du rat, autant chez les neurones que les astrocytes, dans le bulbe olfactif, l'amygdale, le noyau thalamique antérieur, la substance noire, l'aire tegmentale ventrale, le cortex cérébral, le cervelet ainsi que de l'hippocampe (Mazella *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 1998). Le développement d'un anticorps dirigé contre la protéine NTS2 permet ensuite de confirmer sa présence dans plusieurs régions du cerveau du rat, telles que les zones

corticales associées aux systèmes sensoriels, plusieurs régions du tronc cérébral impliquées dans le contrôle de la douleur, le thalamus et le système limbique (Sarret *et al.*, 2003). À l'échelle cellulaire, l'anticorps révèle un immunomarquage davantage associée aux dendrites, en plus d'être exclusif aux neurones. En effet, la traduction du récepteur chez les cellules gliales semble dépendante de leur activation subséquente à un dommage tissulaire, laissant supposer que NTS2 aurait un rôle à jouer dans la réponse neuroinflammatoire et la régénération neuronale (Nouel *et al.*, 1999).

Lorsqu'on se penche sur les régions neuronales présentant une forte expression du récepteur NTS2, il est possible de souligner la colocalisation du récepteur avec le circuit sensoriel nociceptif, ainsi que les structures qui ont été associées à la douleur chronique. Au niveau du diencephale, on retrouve effectivement un immunomarquage important du récepteur NTS2 dans les régions du thalamus, où l'information de la voie sensorio-discriminative spinothalamique achemine l'information, avant de poursuivre jusqu'au cortex somatosensoriel, lui-même riche en récepteurs NTS2 (Figure 7a) (Kandel *et al.*, 2012; Willis, 1985). D'ailleurs, le thalamus jouerait un rôle notoire dans la modulation de la douleur, et des perturbations physicochimiques à son niveau ont été observées dans des conditions de douleur chronique neuropathique (Ab Aziz & Ahmad, 2006; Brüggemann *et al.*, 2001).

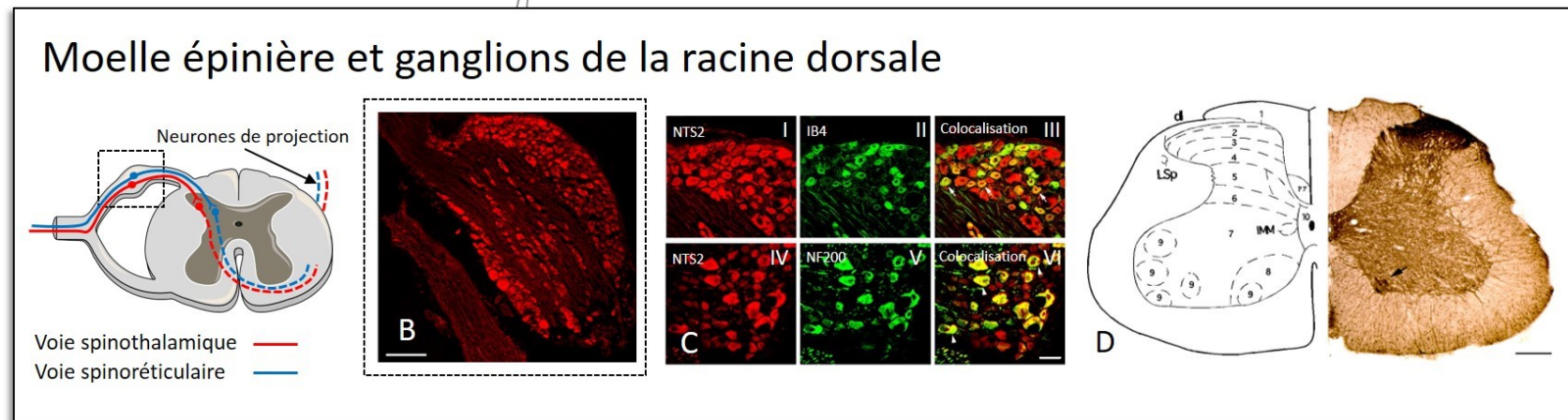
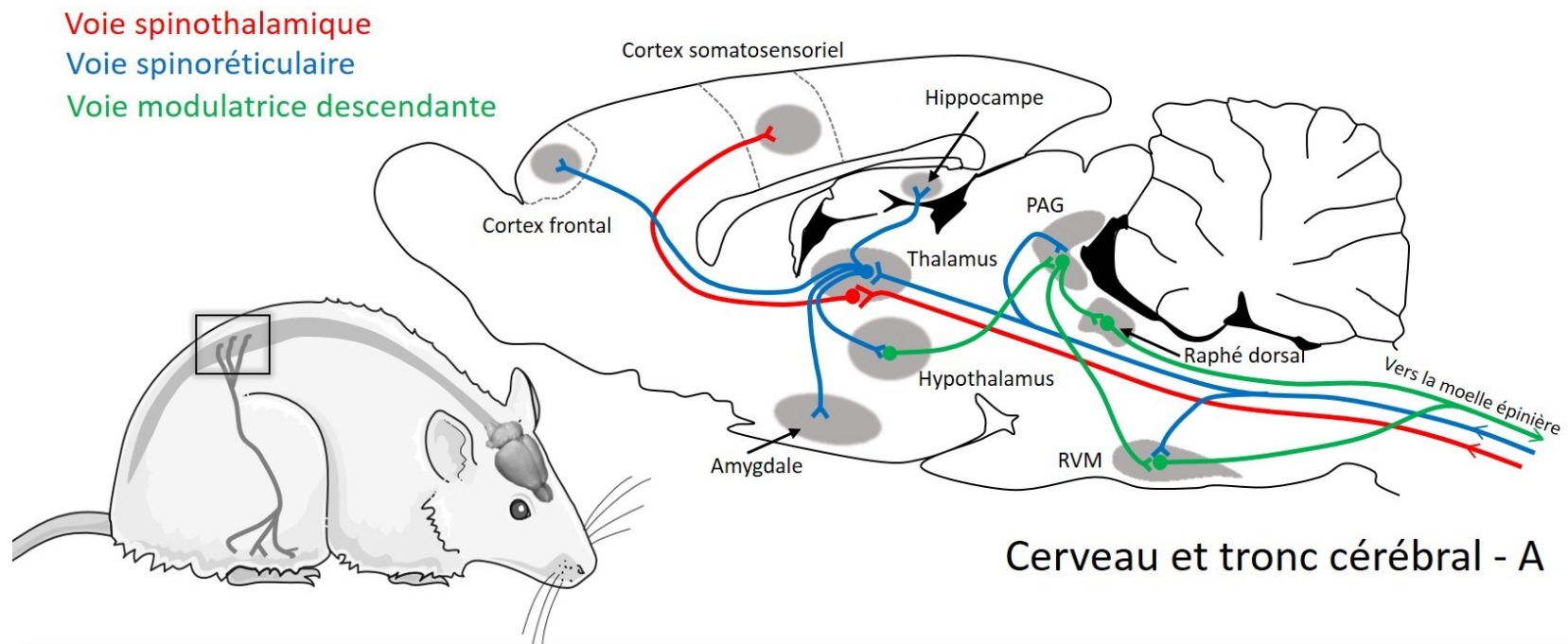
Le système limbique, où parviennent les projections de la voie motivo-affective spinoréticulaire, se trouve également riche en récepteurs NTS2 (Figure 7a). Cette distribution du récepteur est intéressante dans la mesure où l'hypothalamus et l'hippocampe pourraient être impliqués dans l'aspect émotionnel et la mémoire de la douleur (Mutso *et al.*, 2012; Quinones *et al.*, 2015). De plus, des perturbations dans l'amygdale ont été associées avec la détresse et la catastrophisation des symptômes chez des patients atteints de douleur chronique (Jiang *et al.*, 2016). L'équipe du professeur Apkarian suggère d'ailleurs que des variations dans le système corticolimbique pourraient représenter des marqueurs prédictifs de la chronicisation de la douleur (Vachon-Preseu *et al.*, 2016a; Vachon-Preseu *et al.*, 2016b).

Dans le tronc cérébral, un fort immunomarquage est observable dans les structures responsables de la modulation conditionnée de la douleur (MCD), aussi connue sous le terme de contrôle inhibiteur diffus nociceptif (Bouhassira *et al.*, 1990). Au mésencéphale, le récepteur NTS2 est présent au niveau de la substance grise périaqueducale (PAG) et du noyau raphe dorsal (Figure 7a). Dans le bulbe rachidien, on le retrouve dans la région bulbaire

rostro-ventrale (RVM) et ses noyaux (raphé magnus et pallidus, gigantocellulaire, *pars alpa*, et paragigantocellulaire latéral). Le système de modulation endogène de la douleur a été longuement caractérisé et est bien connu pour son rôle dans la réponse aux stimuli nociceptifs (Calvino, 2007). Son implication dans le développement de la douleur chronique est d'ailleurs encore investiguée (Parent *et al.*, 2015; Parent *et al.*, 2016).

Au niveau spinal, le récepteur NTS2 est largement distribué dans les corps cellulaires des ganglions de la racine dorsale (DRG) (Figure 7b). Il colocalise principalement avec les marqueurs IB4 et NF200, qui permettent d'identifier les petits et gros DRG respectivement (Figure 7c). Dans la moelle épinière, on le retrouve dans les laminae superficielles (I-II) de la corne dorsale et dans les zones environnant le canal central, où arborisent les afférences sensorielles primaires responsables de la transmission nociceptive. Plusieurs neurones exprimant le récepteur NTS2 se retrouvent également dans les laminae III à V, où les grosses fibres myélinisées A $\beta$  prennent fin (Figure 7d) (Sarret *et al.*, 2005).

En somme, le récepteur NTS2 présente une distribution qui colocalise étroitement avec l'ensemble du système de transmission nociceptive, en plus des zones impliquées dans la modulation de la douleur. Cette disposition lui accorde ainsi un rôle à jouer au niveau du système sensoriel, en plus d'une implication dans la MCD.



**Figure 7 : Colocalisation du récepteur NTS2 avec le système nociceptif.** (A) Le récepteur NTS2 (zones grises) colocalise avec des structures cérébrales associées à la transmission, l'intégration et la modulation de la douleur. PAG : substance grise périaqueducule, RVM : région bulbaire rostro-ventrale. (B-C) Le récepteur NTS2 est présent dans les ganglions de la racine dorsale et colocalise avec les marqueurs IB4 et NF200, identifiant les petits et gros DRG. (D) Le récepteur NTS2 est distribué dans les laminae superficielles (I-II) de la corne dorsale de la moelle épinière, autour du canal central et dans les laminae III à V. Échelles : (B) 200  $\mu$ m, (C) 50  $\mu$ m, (D) 400  $\mu$ m. Adapté de Sarret *et al.*, 2003 et Sarret *et al.*, 2005 avec permission.

### 1.2.3.3 Propriétés physiologiques

Alors que l'antagoniste du récepteur NTS1, le SR48692, se montrait inapte à bloquer complètement certains effets physiologiques de la neurotensine (Dubuc *et al.*, 1994), il apparaissait évident qu'un second récepteur pouvait reconnaître le neuropeptide et induire une réponse biologique. C'est donc en 1996 que le récepteur NTS2 de rat fut cloné par Chalon et collaborateurs, et celui de souris par Mazella et collaborateurs. Trois ans plus tard, Dubuc et collaborateurs emploient une technologie d'oligonucléotides antisens pour invalider le récepteur NTS2 dans le cerveau de souris (Dubuc *et al.*, 1999a). À l'aide du test des crampes abdominales, ils démontrent une perte de l'analgésie normalement induite par la NT suite au traitement avec les molécules antisens. Cette invalidation n'affecte cependant pas les propriétés hypothermiantes ou neuroleptiques du neuropeptide, qui sont alors considérées NTS1-dépendantes. Ces résultats seront en partie renforcés par un autre groupe qui utilise une lignée de souris déficiente pour le gène NTS2 démontrant un comportement nociceptif altéré au test de la plaque chaude (Maeno *et al.*, 2004).

Malgré le fait que le récepteur NTS2 ait une affinité à la NT moindre que NTS1, l'idée qu'il ne soit pas associé aux conséquences cardio-vasculaires ou thermorégulatrices d'une injection du neuropeptide en fait une cible de choix pour le développement de molécules thérapeutiques analgésiques dépourvues d'effets secondaires. La synthèse de peptidomimétiques de la NT a mené notamment au développement d'une molécule sélective au récepteur NTS2, le JMV-431, fortement utilisé dans la littérature et également dans le cadre de mon projet de maîtrise (Tableau 3) (Doulut *et al.*, 1992; Dubuc *et al.*, 1999a; Labbé-Jullié *et al.*, 1994).

Le groupe d'Alain Beaudet s'intéresse donc au JMV-431 en 2005 et l'injecte par voie intrathécale chez le rat Sprague-Dawley pour vérifier ses propriétés analgésiques dans le test de retrait de la queue (Sarret *et al.*, 2005). Le composé induit une réponse antinociceptive dose-dépendante qui n'est pas perturbée par la co-administration de l'antagoniste NTS1-sélectif (SR48692). Le JMV-431 démontre ensuite ses capacités antalgiques dans un modèle de douleur tonique effectué à l'aide du test à la formaline (Roussy *et al.*, 2009). Dans cette étude, le composé NTS2-sélectif réduit aussi l'activation de *c-fos* dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière des rats, un facteur de transcription normalement exprimé en réponse à un stimulus nociceptif (Menétrey *et al.*, 1989). Une seconde étude appuie ces

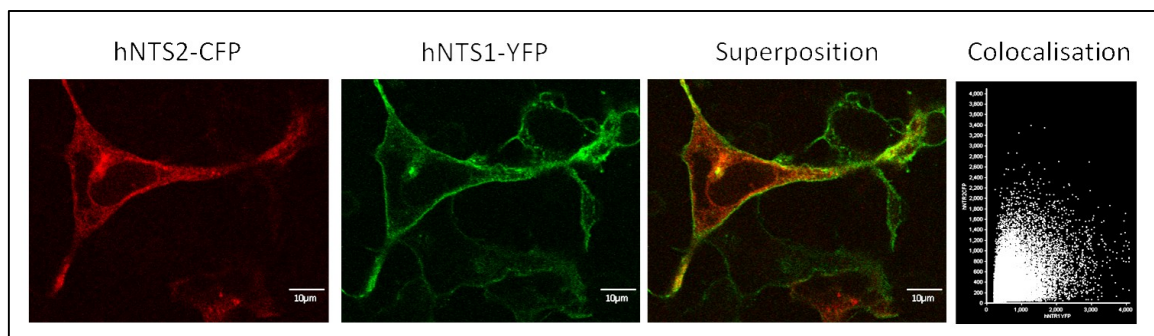
résultats à l'aide d'un autre modèle de douleur tonique, le test des crampes abdominales, et d'un composé NTS2-sélectif distinct, le NT79 (Tableau 3) (Boules *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2012). Enfin, l'intérêt du récepteur NTS2 comme cible thérapeutique dans le traitement de la douleur chronique se renforce avec une étude effectuée sur un modèle de douleur neuropathique chez le rat (Tétreault *et al.*, 2013). La technique de constriction chronique du nerf sciatique est utilisée pour induire une douleur de type neuropathique qui se maintient dans le temps (Bennett & Xie, 1988). L'administration intrathécale de JMV-431 réussit alors à renverser l'allodynie mécanique caractéristique du modèle, en plus de rétablir la distribution du poids de l'animal sur ses pattes.

Les propriétés analgésiques induites par le récepteur NTS2 en font certainement une cible thérapeutique pertinente. Cependant, certaines zones d'ombre entourent encore les mécanismes de trafic cellulaire du récepteur. Pour le prochain chapitre, nous aborderons les différentes évidences qui pointent vers un comportement atypique du récepteur NTS2 par rapport à la majorité des membres de la famille des RCPG.

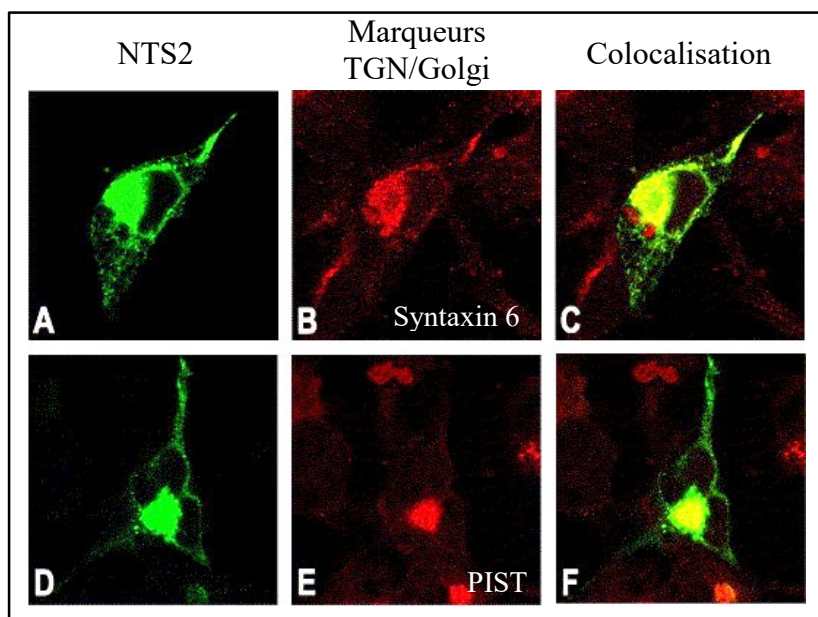
#### 1.2.3.4 Comportement atypique du récepteur

Il est généralement entendu que la grande majorité des récepteurs couplés aux protéines G est adressée à la membrane cytoplasmique de façon constitutive (Achour *et al.*, 2008). Cela signifie donc qu'ils sont déjà présents à la surface cellulaire en condition basale. En ce qui concerne le récepteur NTS2, des expériences de microscopie en fluorescence effectuées au laboratoire ainsi que dans les travaux de Perron et collaborateurs ont démontré un marquage majoritairement intracellulaire (Figure 8) en plus d'une colocalisation avec des marqueurs du réseau trans-golgien (TGN) et de l'appareil de Golgi (Figure 9) (Perron *et al.*, 2006). Cette première constatation nous indique une possible séquestration du récepteur à l'intérieur de compartiments intracellulaires.





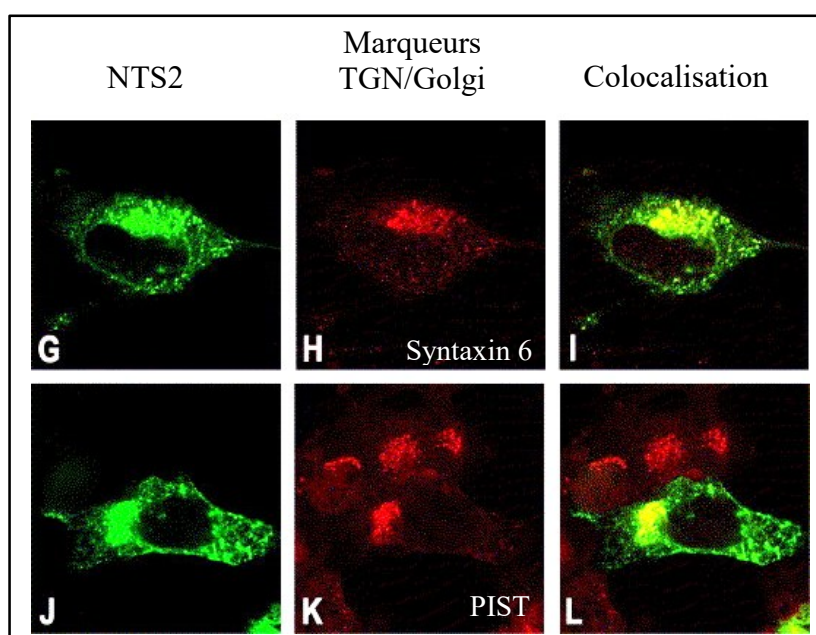
**Figure 8 : Distribution des récepteurs NTS1 et NTS2 dans les cellules neuronales DRG F11.** Le récepteur hNTS1 démontre un marquage membranaire bien défini, alors que le récepteur hNTS2 est faiblement présent à la surface cellulaire. D'ailleurs, les deux récepteurs ne colocalisent pratiquement pas lorsque co-exprimés (Lemire, 2013). Reproduit avec permission.



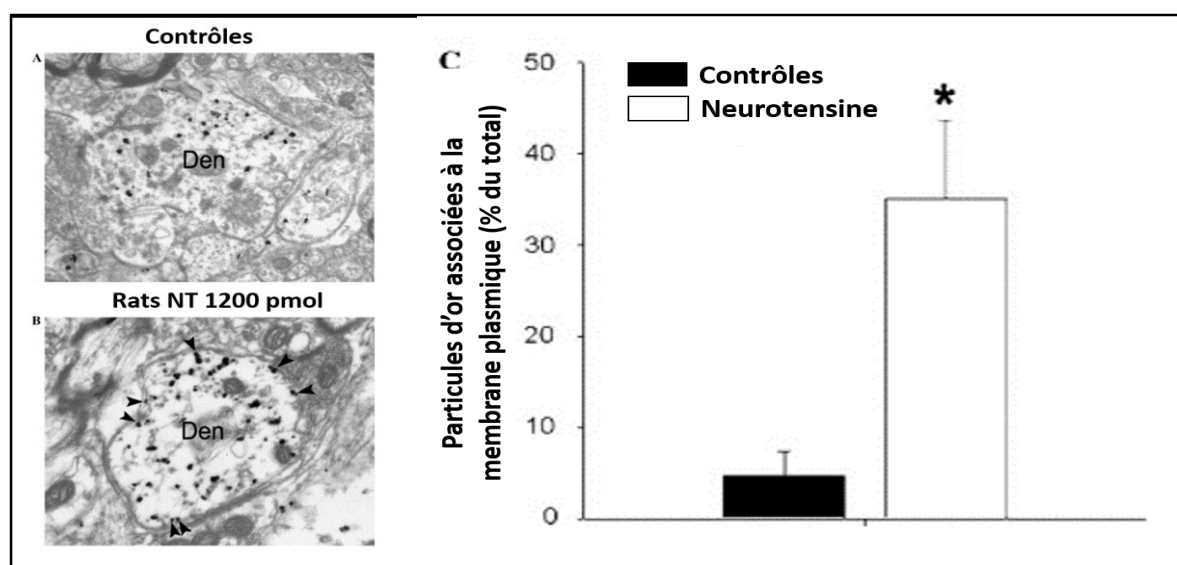
**Figure 9 : Colocalisation du récepteur rNTS2 avec des marqueurs du réseau trans-golgien et de l'appareil de Golgi.** Le récepteur rNTS2 colocalise avec la Syntaxin 6 (TGN) et le marqueur PIST (Golgi) en conditions basales dans les cellules COS-7 (Perron *et al.*, 2006). Reproduit avec permission.

L'équipe nommée ci-haut a également vérifié l'effet d'une stimulation à la neurotensine sur la localisation cellulaire du récepteur. Ils ont d'abord déterminé que l'ajout de NT 1  $\mu$ M pendant 1h00 au milieu des cellules COS-7 provoquait l'apparition d'un marquage ponctiforme (Figure 10). À l'aide d'un marquage immunologique aux billes d'or et de la microscopie électronique, ils ont ensuite pu révéler qu'une administration intrathécale de

neurotensine induisait une hausse de la présence membranaire du récepteur NTS2 dans les laminae superficielles de moelles épinières de rat, 20 minutes suivant l'injection (Figure 11).



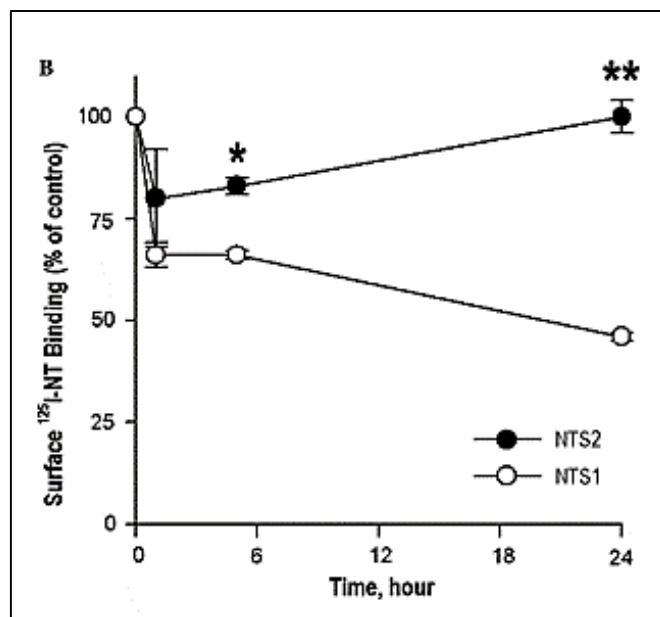
**Figure 10 : Marquage ponctiforme du récepteur NTS2 après stimulation à la NT.** L'ajout de NT 1  $\mu$ M au milieu des cellules COS-7 pendant 1h00 induit la formation d'un marquage ponctiforme caractéristique des vésicules de la voie de sécrétion régulée (Perron *et al.*, 2006). Reproduit avec permission.



**Figure 11 : Association du récepteur NTS2 à la membrane après stimulation à la NT.** Une injection intrathécale de 1200 pmol de neurotensine chez le rat augmente significativement l'association du récepteur NTS2 à la membrane des dendrites (Den) des neurones des laminae superficielles de la moelle épinière (B) en comparaison avec des rats injectés avec de la saline (A) ( $p < 0,05$ ). Adaptée de Perron *et al.*, 2006 avec permission.

Quelques années suivant la publication de ces données, un article de Zhao et collaborateurs démontre finalement la présence du récepteur NTS2 dans les vésicules à corps dense (LDCV) extraites de moelles épinières de rat (Zhao *et al.*, 2011). L'accumulation de ces évidences suggère l'identification d'un nouveau récepteur allant rejoindre la petite famille des RCPG adressés vers la voie de sécrétion régulée, qui regroupe déjà les récepteurs PAR, le récepteur D<sub>1</sub>, le récepteur opioïde  $\delta$ , les récepteurs de l'odorat, le récepteur du GnRH, le récepteur adrénergique  $\alpha_{1D}$  et le récepteur du LH comme membres potentiels (Anchour *et al.*, 2008).

De façon générale, la présence des récepteurs couplés aux protéines G à la membrane cellulaire est un événement hautement régulé (Tian *et al.*, 2014). Cette régulation peut se manifester de trois façons principales : la désensibilisation, l'internalisation avec ou sans dégradation et la régulation négative. Le but commun est d'assurer la transmission du stimulus en un signal intracellulaire de durée et d'intensité appropriée. Ainsi, après un stimulus prolongé, il sera normal d'observer un RCPG réfractaire au stimulus (désensibilisation), absent de la membrane cellulaire (internalisation avec ou sans dégradation) ou même avec un niveau d'expression diminué (régulation négative) (Rang & Dale, 2012). Ces propriétés représentent d'ailleurs l'une des causes du développement de la tolérance vis-à-vis de certaines médications. De façon intéressante, le récepteur NTS2 ne semble pas obéir à ces lois. En effet, Perron et collaborateurs ont démontré qu'une exposition prolongée du récepteur NTS2 à son ligand provoquait plutôt une persistance de celui-ci à la surface des cellules COS-7. Dans la figure 12, vous observerez d'ailleurs la nette différence qui existe entre les récepteurs NTS1 et NTS2, où NTS1 répond davantage au profil classique du comportement d'un RCPG.



**Figure 12 : Persistance du récepteur NTS2 à la membrane cytoplasmique en présence prolongée de neurotensine.** L'incubation continue des cellules COS-7 avec 1  $\mu$ M de neurotensine induit une faible internalisation du récepteur NTS2, suivie d'un retour à la membrane plasmique, alors qu'elle diminue la présence membranaire du récepteur NTS1 de près de 50% ( $p < 0,01$ ). La présence des récepteurs à la surface cellulaire a été évaluée à l'aide de neurotensine radioactive (Perron *et al.*, 2006). Reproduit avec permission.

Les différentes facettes du comportement atypique du récepteur NTS2 peuvent s'avérer des atouts dans la caractérisation d'une nouvelle cible thérapeutique, notamment dans la lutte contre les effets secondaires et le développement de la tolérance. Maintenant que plusieurs évidences pointant vers un adressage régulé pour le récepteur NTS2 ont été soulevées, il était question d'identifier les partenaires protéiques pouvant être responsables de la régulation de celui-ci.

#### 1.2.3.5 Partenaire d'interaction du récepteur

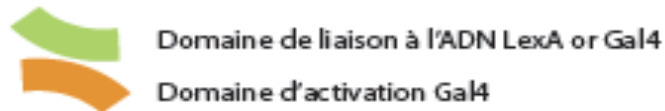
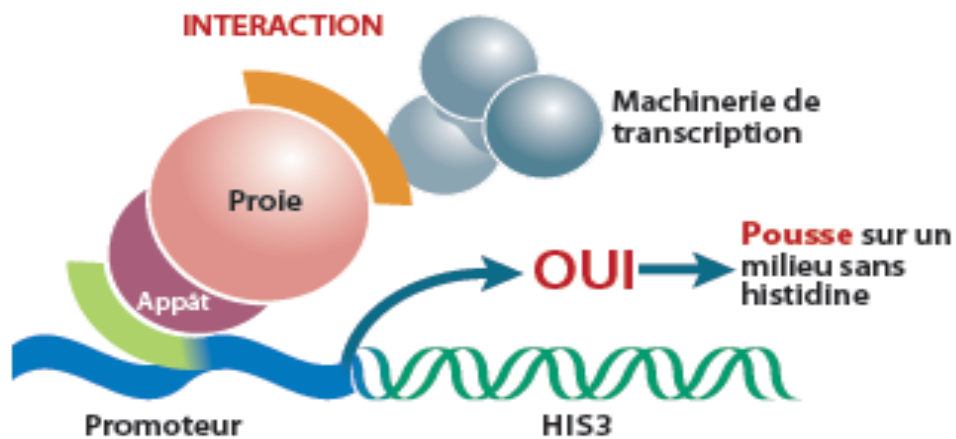
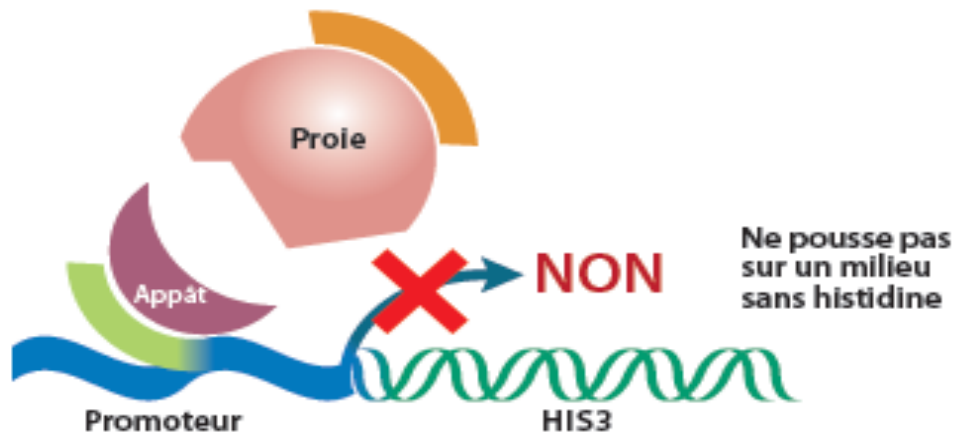
Entre 2010 et 2013, Myriam Lemire a effectué sa maîtrise chez Philippe Sarret sur l'étude de l'interaction fonctionnelle du récepteur NTS2 avec la sécrétogranine III. Ses principaux résultats seront présentés ici, puisqu'ils constituent une base importante sur laquelle mon propre projet a pris naissance.

Tout d'abord, un essai de criblage double hybride chez la levure a été effectué afin de mettre en lumière les principaux partenaires protéiques du récepteur NTS2. En résumé, cet essai repose sur la reconstruction d'un facteur de transcription qui induit la transcription d'un gène rapporteur (Fields, 2005). La protéine d'intérêt est utilisée à titre d'appât et est fusionnée

au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription (Figure 13). Les proies, quant à elles, sont fusionnées au domaine d'activation du facteur de transcription. Lorsqu'il y a interaction entre l'appât et la proie, les deux domaines du facteur de transcription se rapprochent suffisamment pour constituer un facteur fonctionnel et induire la transcription du gène rapporteur. Ce gène rapporteur codera, par exemple, pour une protéine conférant une résistance qui permettra à la levure de pousser sur un milieu sélectif.

Dans notre cas, la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur NTS2 a été utilisée comme appât, alors qu'une banque d'ADNc de régions cérébrales de rat présentant une forte expression de NTS2 a servi à constituer les proies (substance noire, VTA et mésencéphale). La 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur a été sélectionnée spécifiquement dû à la présence de plusieurs motifs d'internalisation et de triage parmi sa séquence d'acides aminés, qui étaient susceptibles d'être reconnus par des partenaires protéiques (Figure 14). En effet, on y retrouve les motifs tyrosine (YxxØ), dileucine ([D/E]xxLL), endosomal (YS) et RHK. Les motifs YxxØ et [D/E]xxLL ont été largement caractérisés et sont connus pour leur participation dans les processus d'internalisation et de trafic cellulaires de plusieurs récepteurs et protéines membranaires (Bonifacino & Traub, 2003; Kirchhausen, 1999; Pandey, 2009). Concernant les motifs endosomaux YS, ceux-ci permettent un triage du TGN vers la voie endosomale ou lysosomale (Marks *et al.*, 1997). Enfin, le motif RHK représente un groupement conservé de résidus basiques, souvent retrouvé dans les régions d'interaction entre deux protéines (Guharoy & Chakrabarti, 2010; Szasz *et al.*, 1986). Le criblage, effectué en collaboration avec la compagnie Hybridgenics S.A. (Paris, France), a permis d'identifier la protéine sécrétogranine III (SgIII) comme principal partenaire d'interaction du récepteur.

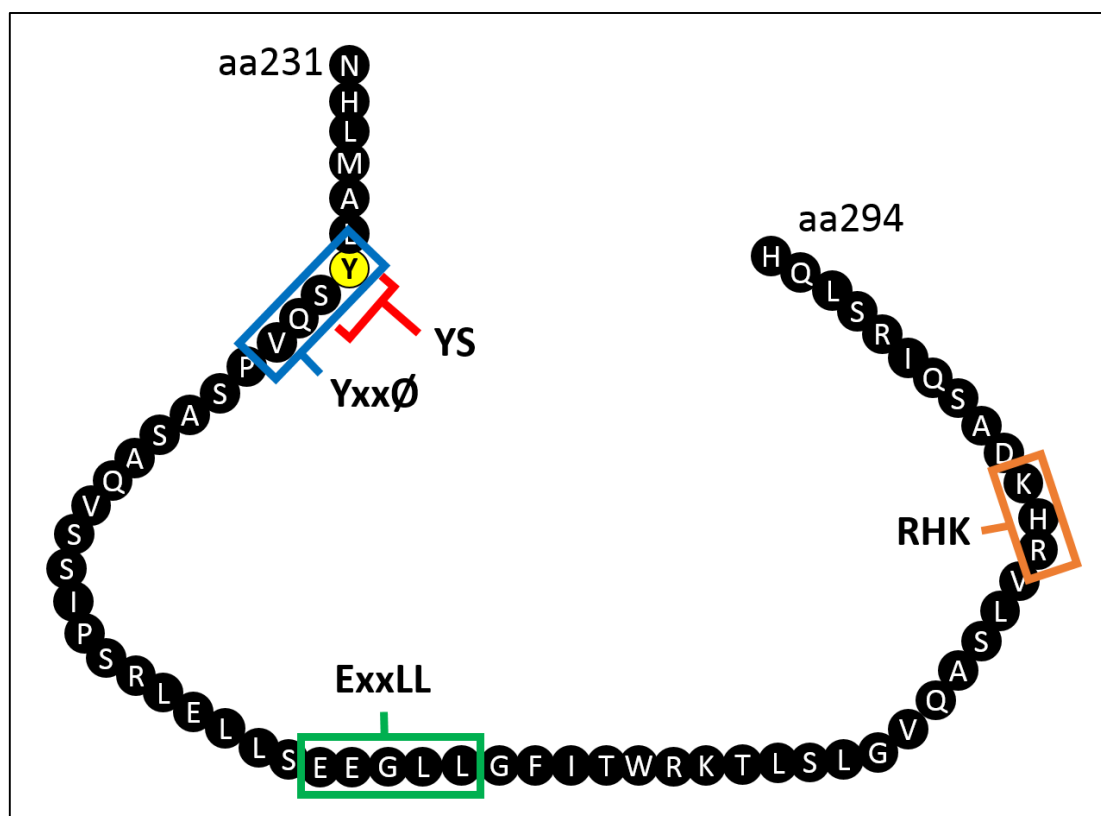
## Principe du double hybride



L'interaction de deux protéines reconstitue un facteur de transcription actif et permet aux levures de pousser

- Appât: protéine d'intérêt
- Proie : protéine partenaire de l'appât

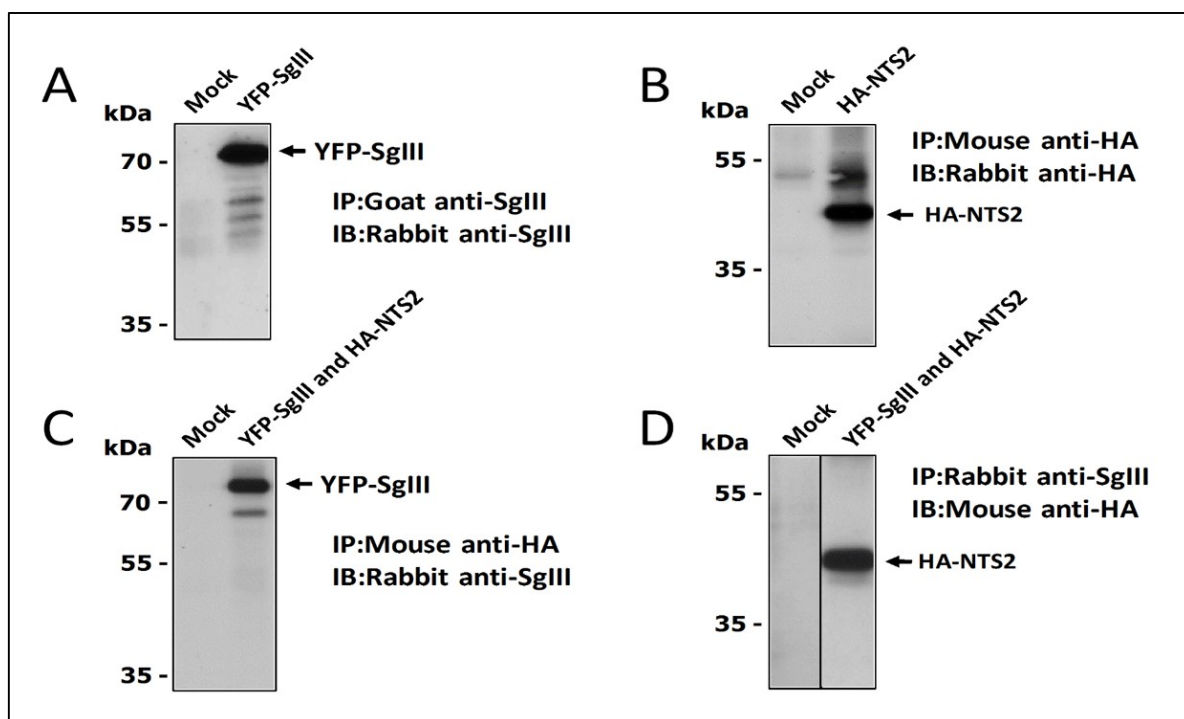
Figure 13 : Principe général du criblage double hybride chez la levure.



**Figure 14 : Séquence de la 3e boucle intracellulaire du récepteur NTS2.** La 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur contient plusieurs motifs d'internalisation et de recyclage susceptibles d'être reconnus par des partenaires protéiques. Motifs tyrosine (YxxØ), dileucine ([D/E]xxLL), endosomal (YS) et RHK.

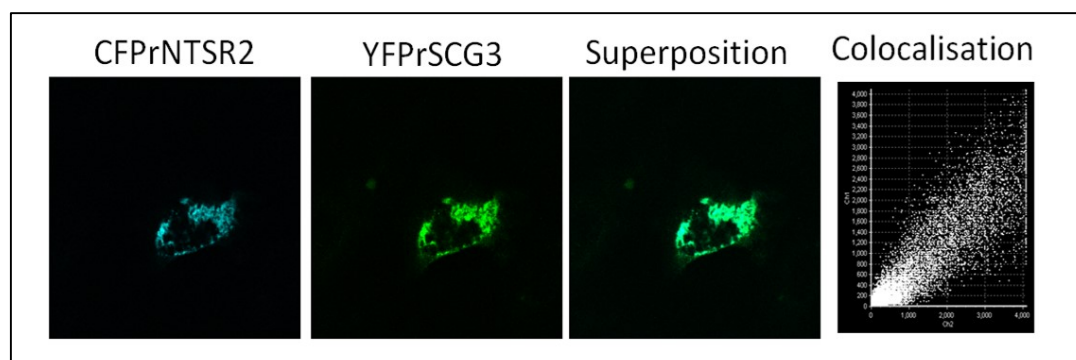
Afin de supporter l'identification de la sécrétogranine III comme partenaire protéique du récepteur NTS2, des expériences de co-immunoprécipitation ont été effectuées sur des lysats de cellules HEK293 co-transfectées avec le récepteur NTS2 et la protéine SgIII. Ces essais ont permis de révéler la présence du récepteur lorsque SgIII était retenue à l'immunoprécipitation, et vice-versa, appuyant la théorie d'une interaction entre les deux protéines (Figure 15).





**Figure 15 : Co-immunoprécipitation des protéines NTS2 et SgIII après co-transfection dans les cellules HEK293.** (A-B) Les protéines YFP-SgIII et HA-NTS2 produisent des bandes de 80 et 45 kDa respectivement sur immunobuvardage (IB) après immunoprécipitation (IP). (C-D) Les protéines HA-NTS2 et YFP-SgIII co-immunoprécipitent après avoir été co-transfectées dans les cellules HEK293. Adaptation de Lemire, 2013, effectuée avec permission.

Enfin, la microscopie en fluorescence a permis de révéler une colocalisation des deux protéines alors qu'elles étaient co-transfectées dans les cellules HEK293 (Figure 16).

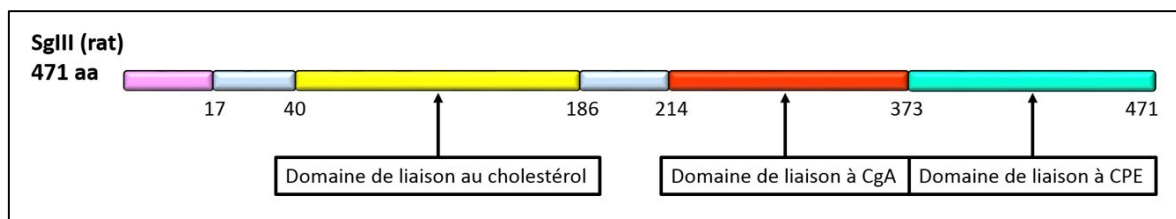


**Figure 16 : Distribution subcellulaire et colocalisation des protéines CFPrNTSR2 et YFPrSgIII.** Coefficient de Pearson =  $0,66 \pm 0,2$  et coefficient de Manders =  $0,83 \pm 0,09$ . Microscope confocal Olympus IX81, Fluoview FV1000 (Lemire, 2013). Reproduit avec permission.



### 1.3 La sécrétogranine III

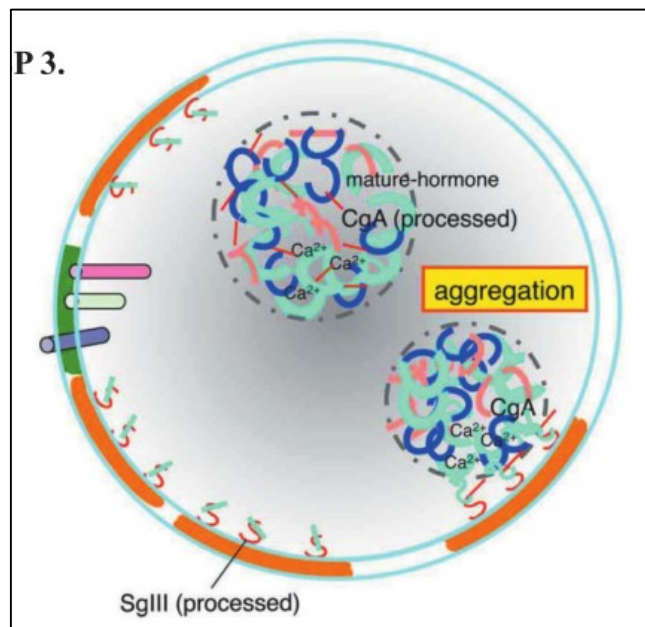
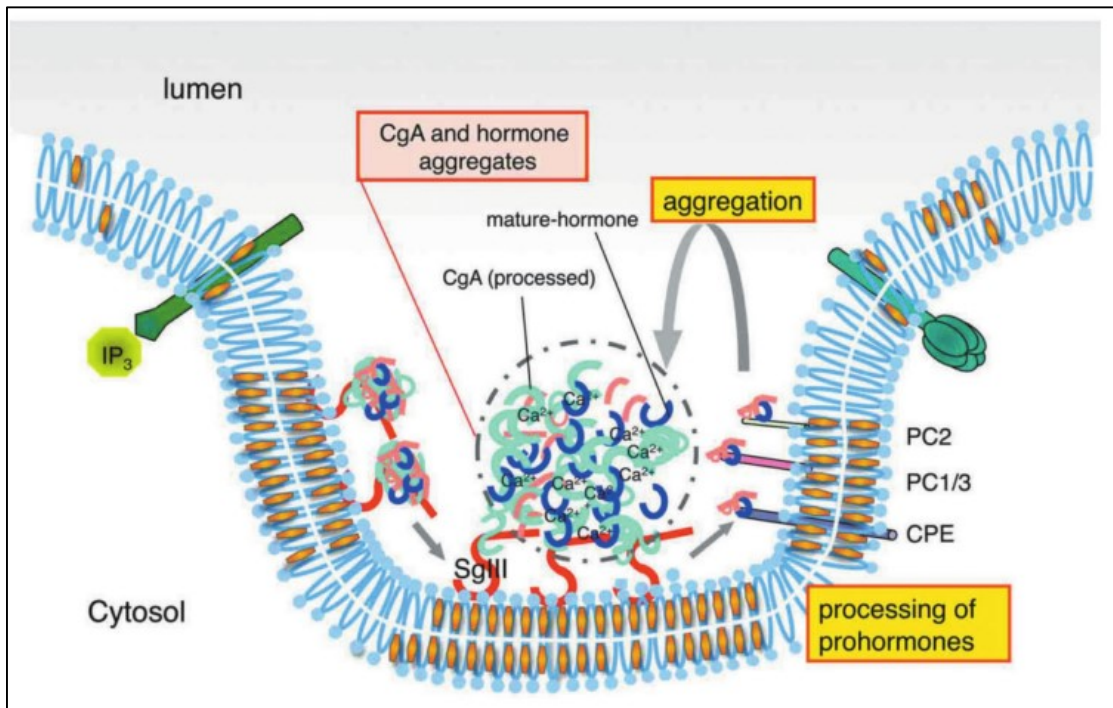
La sécrétogranine III est une protéine de 471 acides aminés qui a un poids moléculaire de 56 kDa (Figure 17). La protéine fut clonée pour la première fois en 1990 à partir d'une librairie d'ADNc de cerveau de rat (Ottiger *et al.*, 1990). SgIII est principalement retrouvée dans les LDCV des cellules neuroendocrines, comme tous les membres de la famille des granines (Rong *et al.*, 2002).



**Figure 17 : Représentation de la protéine SgIII.** La sécrétogranine III contient 471 résidus et possède un domaine de liaison au cholestérol (23-186), un domaine de liaison à la chromogranine A (214-373) et un domaine de liaison à la carboxypeptidase E (374-471). D'après Hosaka *et al.*, 2010, figure adaptée avec permission.

#### 1.3.1 La famille des granines

La famille des granines est constituée de la chromogranine A (CgA), la chromogranine B (CgB), la sécrétogranine II (SgII) ainsi que des sécrétogranines III (SgIII), IV et V (Holthuis & Martens, 1996). Ces protéines sont composées d'une chaîne polypeptidique de 180 à 700 acides aminés portant un peptide signal en position N-terminale leur permettant d'être dirigées vers le réticulum endoplasmique, et éventuellement l'appareil de Golgi, après leur traduction ribosomale (Taupenot *et al.*, 2003). Les granines sont généralement riches en acides aminés acides, résistantes à la chaleur, et strictement localisées aux vésicules de sécrétion (Hosaka & Watanabe, 2010). Elles possèdent la propriété de s'agréger à un pH de 5-6 et en présence de calcium (10-40 nM), des conditions qui reflètent l'état du milieu de la lumière trans-golgiennne. Ces caractéristiques sont hautement pertinentes en regard de leur rôle majeur dans la formation des vésicules à corps dense. En effet, selon le modèle proposé par Hosaka et Watanabe (Figure 18), les granines formeraient des agrégats solubles avec les peptides destinés à la sécrétion. C'est alors que la SgIII interviendrait dans le but d'ancrer ces agrégats à la membrane des vésicules, puisque c'est la seule granine à posséder un domaine de liaison au cholestérol (Hosaka *et al.*, 2004).



**Figure 18 : Modèle de triage des prohormones induit par les granines.** Les granines (en turquoise) forment un agrégat avec les peptides destinés à la sécrétion (roses et bleus) dans la lumière trans-golgiennne. L'interaction des granines avec SgIII (en rouge), qui est liée aux domaines riches en cholestérol, induit le repliement de la vésicule de sécrétion. Ensuite, les carboxypeptidases (CPE) et pro-protéines convertases (PC1/3 et PC2) assurent la maturation des propeptides, en plus du clivage des granines. Cela permet à l'agrégat constitué d'hormones matures d'être libéré au cœur des vésicules (Hosaka & Watanabe, 2010). Reproduit avec permission.

### 1.3.2 Rôles de la sécrétogranine III

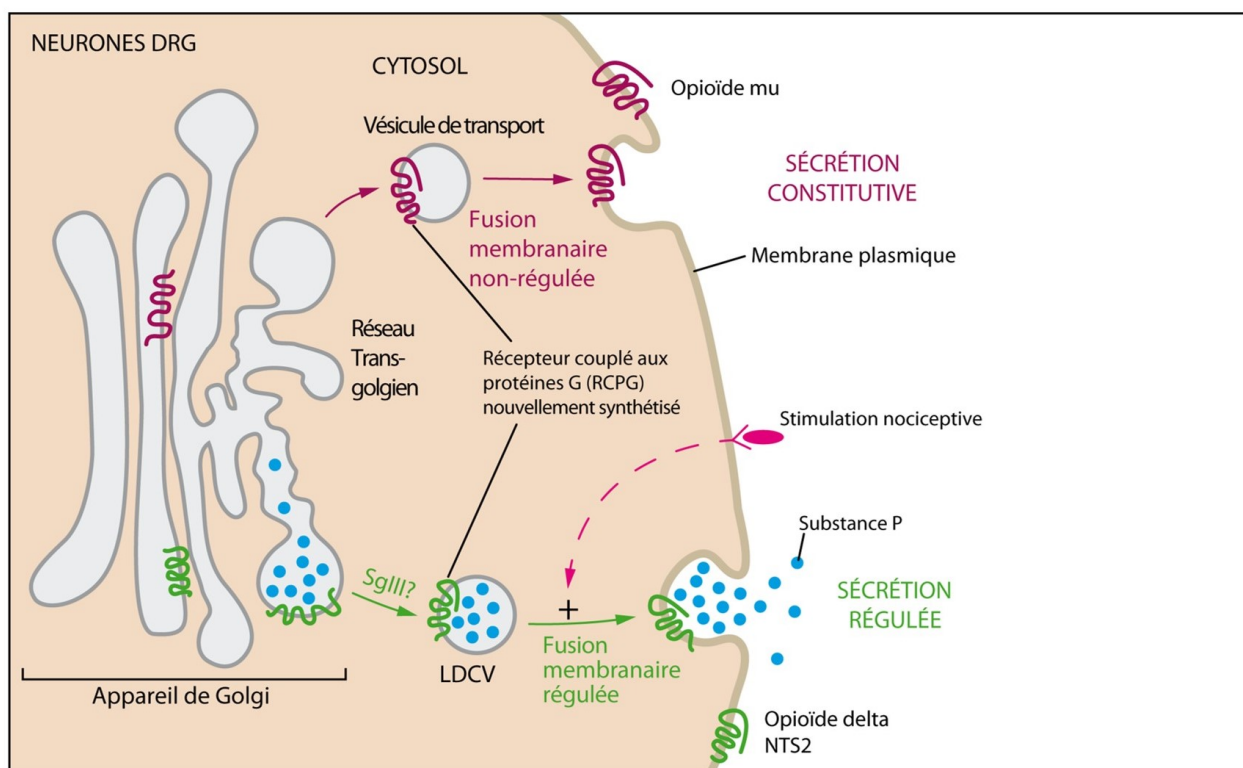
Comme l'agrégation n'est pas suffisante à elle seule pour induire le triage des protéines vers les vésicules de sécrétion, il a été supposé que des interactions protéines-protéines impliquant les granines devaient également avoir lieu au moment de la formation des granules sécrétoires (Tooze *et al.*, 2001). En effet, la SgIII s'est montrée apte à interagir avec la chromogranine A dans les cellules hypophysaires PC12 (Hosaka *et al.*, 2002). De plus, SgIII présente un domaine de liaison au cholestérol qui en fait donc une protéine ancrée dans les radeaux lipidiques de la membrane trans-golgiennne (Hosaka *et al.*, 2004). La protéine est ainsi reconnue comme un intermédiaire entre les agrégats et la membrane vésiculaire, ce qui contribuerait à la formation même des granules de sécrétion (Hosaka & Watanabe, 2010).

À ce jour, seules la chromogranine A et la carboxypeptidase E ont été reconnues comme partenaires d'interaction officiels de la SgIII (Hosaka *et al.*, 2002; Hosaka *et al.*, 2005). Il y a cependant une grande probabilité que la protéine entretienne des interactions avec une multitude d'autres protéines, étant donné qu'elle est retrouvée de façon plus ubiquitaire que CgA et CPE dans les cellules neuroendocrines (Ottiger *et al.*, 1990; Sakai *et al.*, 2004).

Ainsi, la protéine SgIII est connue pour ses fonctions importantes dans la voie de sécrétion régulée, en plus d'entretenir une possible interaction avec le récepteur NTS2. Ces nouvelles informations viennent donc appuyer les preuves présentées précédemment en lien avec l'adressage régulé du récepteur. Dans le but de visualiser l'impact de cette voie de sécrétion sur les paramètres pharmacodynamiques de NTS2, les différentes voies de sécrétion cellulaires seront abordées dans le prochain chapitre.

### 1.4 Voies de sécrétion cellulaires

La cellule eucaryote emploie deux voies de sécrétion principales afin d'adresser les protéines vers la surface, ou pour les sécréter dans l'espace extracellulaire (Figure 19). La première est la voie de sécrétion constitutive, une voie de sécrétion simplifiée qui a lieu en tout temps dans la cellule et chez tous les types cellulaires. La seconde consiste en la voie de sécrétion régulée, qui nécessite la présence d'un stimulus particulier. Cette voie est présente uniquement chez certains types cellulaires (Kelly, 1985). Quelle que soit la voie empruntée, les protéines sécrétoires nouvellement synthétisées sont d'abord transloquées vers la lumière du réticulum endoplasmique afin d'être repliées et glycosylées, s'il y a lieu (Swanton & Bulleid, 2003). Redirigées ensuite vers l'appareil de Golgi et le réseau trans-golgien (TGN), les protéines seront triées entre les deux voies de sécrétion.



**Figure 19 : Voies de sécrétion cellulaires neuronales.** La majorité des RCPG emprunte la voie de sécrétion constitutive (ex. opioïde  $\mu$ ), mais certains récepteurs sont cependant soumis à une sécrétion régulée (ex. opioïde  $\delta$  et NTS2).

#### **1.4.1 Voie de sécrétion constitutive**

Tel que mentionné précédemment, la voie de sécrétion constitutive ne nécessite pas de signal particulier pour être activée (Ponnambalam & Baldwin, 2003). Les vésicules impliquées dans ce transport seraient pléomorphiques avec un diamètre avoisinant les 100 à 200 nm. Une fois arrivées à la membrane, elles pourraient se fusionner à celle-ci ou retourner vers le cytoplasme (Toomre *et al.*, 2000). En réalité, la voie de sécrétion constitutive dépend uniquement de la disponibilité des produits à sécréter et représenterait une voie de sécrétion « par défaut ». Bien qu'il s'agisse de la voie de sécrétion la plus commune, un minimum d'informations est disponible au sujet de celle-ci. En effet, la voie de sécrétion régulée semble avoir été beaucoup plus étudiée et présente une large documentation scientifique.

#### **1.4.2 Voie de sécrétion régulée**

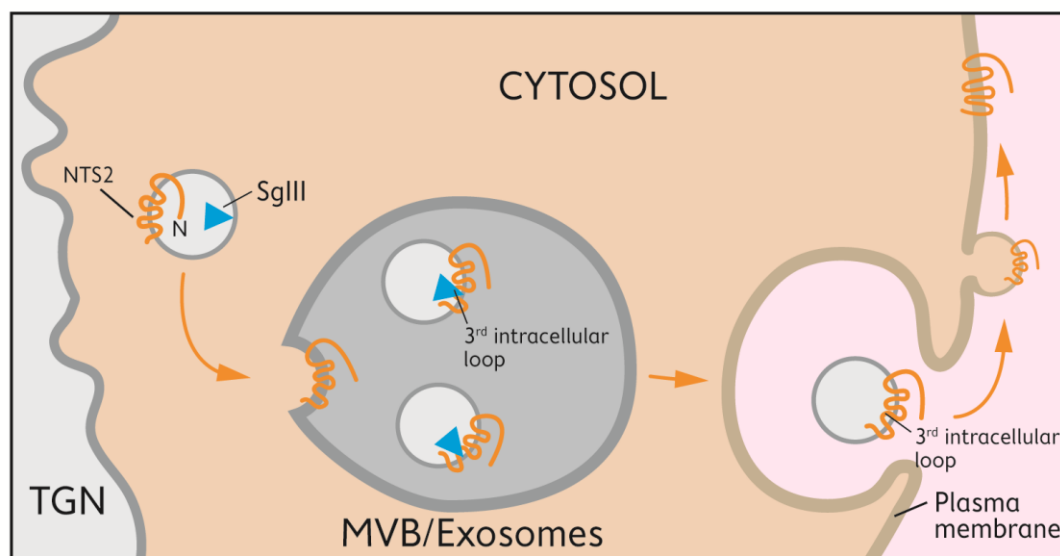
Les vésicules de transport de la voie de sécrétion régulée sont de larges vésicules à corps dense (LDCV) exprimées par les neurones et autres cellules neurosécrétrices. Il ne faut pas confondre celles-ci avec les vésicules synaptiques qui servent à transporter les neurotransmetteurs de faible poids moléculaire. En effet, les vésicules à corps dense se distinguent par leur contenu riche en granines et par le transport d'un large spectre de molécules actives, telles que des peptides, des hormones, l'ATP et des amines biogéniques (Meldolesi *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010). Lorsqu'observées en microscopie électronique, les LDCV apparaissent rondes, compactes, enveloppées d'une seule membrane et de grosseur variable (60-300 nm de diamètre).

Tel que mentionné dans le chapitre portant sur la famille des granines, l'agrégation du contenu des vésicules n'est pas suffisant pour induire leur formation. Deux processus supplémentaires semblent effectivement nécessaires pour provoquer le bourgeonnement des granules à partir du réseau trans-golgien. Premièrement, la présence de radeaux lipidiques riches en sphingomyéline et en cholestérol est primordiale (Tooze *et al.*, 2001). En second lieu, le contenu destiné à être sécrété doit interagir avec la membrane vésiculaire (Thiele *et al.*, 1997; Wasmeier *et al.*, 2002). Concernant ces mécanismes, nous savons maintenant que les domaines riches en cholestérol de la membrane permettent l'ancrage de protéines, notamment la SgIII, servant à l'amarrage du contenu vésiculaire. Enfin, les LDCV poursuivent leur maturation avec la conversion des pro-hormones par les pro-protéines

convertases et par la fusion homotypique d'autres granules dans le but d'augmenter la masse du contenu sécrétoire (Arvan & Castle, 1998; Urbé *et al.*, 1998). Ainsi, les granules de sécrétion seront prêtes à délivrer leur contenu suivant une stimulation de la cellule, soit par dépolarisation membranaire ou par un processus récepteur-dépendant.

S'il existe plusieurs voies de sécrétion au sein d'une même cellule, les protéines sécrétées doivent nécessairement être assignées vers l'une ou l'autre de ces voies au niveau du TGN. En 1980, Blobel propose que ce triage soit possible grâce à des motifs protéiques et des protéines de transport aptes à reconnaître ces motifs (Blobel, 1980). Ce modèle s'avérera véridique, alors qu'on identifie progressivement les motifs et protéines d'interaction qui permettent à certains neuropeptides et récepteurs d'être dirigés vers la voie de sécrétion régulée (Sun *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2010). Cependant, ces motifs et protéines d'interaction semblent varier selon les protéines sécrétées. Par exemple, les boucles disulfures N-terminales de la pro-opiomélanocortine (POMC) et de la pro-enképhaline leur permettent d'interagir avec la protéine carboxypeptidase E afin d'être délivrées dans les granules de la voie de sécrétion régulée (Loh *et al.*, 2002), alors que la paire de résidus basiques clivables du proneuropeptide Y semble suffisante à induire sa rétention dans les LDCV (Brakch *et al.*, 2002). Dans le cas du récepteur opioïde  $\delta$  (DOP), une potentielle interaction entre la 3<sup>e</sup> boucle extracellulaire du récepteur et du domaine de la substance P de la protachykinine induirait son triage vers la voie de sécrétion régulée (Guan *et al.*, 2005).

Jusqu'à maintenant, notre hypothèse d'interaction entre le récepteur NTS2 et la SgIII semble être tout à fait probable. Il y a cependant un problème de positionnement entre les deux protéines si on considère que l'interaction se réalise effectivement via la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur. En effet, du fait que le récepteur NTS2 est un RCPG, sa 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire se retrouve normalement à l'extérieur de la vésicule de sécrétion, alors que les derniers chapitres ont bien établis que la protéine SgIII se trouvait à l'intérieur des granules sécrétoires. Afin d'expliquer ce phénomène particulier, nous proposons un modèle audacieux impliquant les corps multi-vésiculaires comme intermédiaires de sécrétion, dans lesquels la vésicule transportant le récepteur NTS2 subirait une étape d'endocytose avant d'être adressée à la membrane plasmique (Figure 20).



**Figure 20 : Modèle d'adressage membranaire par les corps multi-vésiculaires.** Une étape d'endocytose dans les corps multi-vésiculaires permettrait de retourner la vésicule transportant le récepteur NTS2 pour que sa 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire soit accessible à l'interaction avec la protéine SgIII.

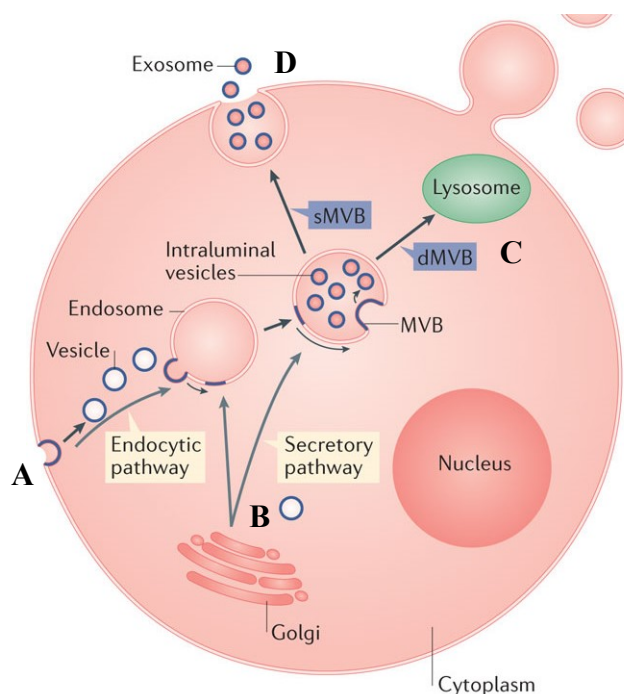
#### 1.4.3 Corps multi-vésiculaires et exosomes

Les corps multi-vésiculaires (MVB) sont des ultrastructures de 400-500 nm de diamètre qui servent d'intermédiaires dans certaines voies de transport cellulaires (Gruenberg & Stenmark, 2004). Originellement associés au transport rétrograde des molécules membranaires vers les voies de dégradation lysosomales, il est maintenant entendu que les corps multi-vésiculaires peuvent également servir à l'exocytose de petites vésicules appelées exosomes ou vésicules extracellulaires (Keller *et al.*, 2006). Pour pénétrer les corps multi-vésiculaires, les vésicules provenant de la membrane cytoplasmique ou du cytoplasme fusionnent à la membrane des MVB et forment de nouvelles vésicules à l'intérieur de ceux-ci (Wollert & Hurley, 2010).

Les exosomes sont de petits transporteurs lipidiques de 30-100 nm relâchés dans le milieu extracellulaire suite à la fusion du MVB à la membrane cytoplasmique (Figure 21). Ces petits transporteurs peuvent ensuite contribuer à la communication autocrine, paracrine et même endocrine via la circulation sanguine (Lakkaraju & Rodriguez-Boulan, 2008). Les exosomes peuvent effectivement transporter des micros-ARNs, des peptides et même des protéines membranaires. Leur rôle dans la réponse immunitaire a d'ailleurs été largement documenté, notamment quant à leur capacité à transporter les complexes majeurs

d'histocompatibilité (MHC) d'une cellule à l'autre dans le but de participer à la présentation antigénique (Li *et al.*, 2006).

Au système nerveux central, l'intégrité neuronale repose sur la communication étroite entre les cellules neuronales et les cellules gliales. Des études récentes ont démontré que cette interaction reposait en partie sur l'échange de vésicules extracellulaires, comme les exosomes (Fauré *et al.*, 2006). Ceux-ci participeraient à la régulation du dialogue synaptique, à la survie neuronale, à la réponse immunitaire induite par les cellules gliales et à la plasticité synaptique. De plus, ces transporteurs extracellulaires pourraient être des facteurs, voire des marqueurs, de certaines maladies neurodégénératives et de cancers cérébraux (Budnik *et al.*, 2016). En regard de ces informations, et considérant que l'étude des exosomes représente un domaine d'étude relativement récent et en pleine expansion, il ne nous apparaît pas impossible qu'un RCPG puisse emprunter ce mécanisme de transport à des fins de communication intercellulaire au système nerveux central.



**Figure 21 : Représentation du transport et de l'exocytose des exosomes.** D'après ce modèle, le contenu des corps multi-vésiculaires peut provenir de la membrane cytoplasmique (A) ou du réseau trans-golgien (B) avant d'être dégradé dans les lysosomes (C) ou relâché dans l'espace extracellulaire sous forme d'exosomes (D) (Budnik *et al.*, 2016). Reproduit avec permission.



## Hypothèse et objectifs

La douleur chronique représente un fardeau socio-économique suffisamment important pour qu'on y investisse des ressources afin d'améliorer le sort des patients qui en sont atteints. Dans l'optique du développement d'une nouvelle classe d'analgésiques, le système neurotensinergique a fait ses preuves en termes d'efficacité, surpassant même la morphine lorsque comparés à molarité équivalente. De plus, le récepteur NTS2 semble une cible de choix en regard de la sécurité, puisqu'il n'induit pas les effets secondaires associés normalement à la neurotensine, telles que l'hypotension et l'hypothermie. Cependant, son comportement particulier nous indique qu'il est plutôt absent de la membrane cellulaire en condition basale, ce qui le rend faiblement disponible à la liaison d'un agoniste.

Des études précédentes au laboratoire ont mis en évidence une interaction entre le récepteur NTS2 et la protéine SgIII, une protéine résidente de la voie de sécrétion régulée. D'après ces informations, nous pensons que cette interaction pourrait influencer l'activité fonctionnelle du récepteur en régulant son adressage à la membrane cytoplasmique et en affectant ses propriétés analgésiques. Cette hypothèse à la base de mon projet de maîtrise a mené à l'établissement de plusieurs objectifs qui seront adressés dans ce mémoire.

Tout d'abord, nous voulions mettre au point un modèle cellulaire neuronal exprimant SgIII et NTS2 afin de poursuivre les expérimentations avec des outils qui se rapprochent davantage de la réalité physiologique qui nous intéresse. Ce modèle nous permettrait donc de déterminer l'effet d'une invalidation génique et d'une surexpression de la protéine SgIII sur l'adressage membranaire du récepteur NTS2. De plus, comme nous savons que le récepteur NTS2 emprunte la voie de sécrétion régulée, il était intéressant de vérifier l'impact de différents stimuli sur l'interaction NTS2-SgIII ainsi que sur l'adressage membranaire du récepteur.

Comme la recherche *in vivo* est une importante facette de notre expertise, il nous apparaissait nécessaire de valider nos observations effectuées *in vitro* chez l'animal. C'est pourquoi il était également question de vérifier l'impact d'une invalidation génique de la protéine SgIII sur les effets analgésiques d'un agoniste NTS2-sélectif dans un modèle de douleur aiguë chez le rat.

Enfin, nous voulions explorer une approche qui permettrait de vérifier l'hypothèse d'interaction NTS2-SgIII impliquant les corps multi-vésiculaires et les exosomes.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Mise au point d'un modèle *in vitro* pour l'étude de l'interaction NTS2-SgIII

#### 2.1.1 Clonages

Les constructions 2HA-rNTS2, rNTS2-YFP/CFP et CFP/YFP-rSgIII ont été utilisées dans le cadre de ce projet.

La construction 2HA-rNTS2 a été produite à partir de l'amplification de la séquence du récepteur NTS2 de rat (NCBI Reference Sequence : NM\_022695.2) contenu dans le vecteur pTarget (Promega, WI, USA). Les amorces NTS2 sens et antisens (Tableau 5) utilisées pour amplifier la séquence de NTS2 contiennent les sites de restriction des enzymes BglII et EcoR1 pour permettre l'insertion de l'ADNc du récepteur dans le vecteur 2HA-C1. Ce vecteur a été obtenu à partir du vecteur pEYFP-C1 (Clontech Laboratories, CA, USA), dont la portion codante pour l'étiquette EYFP a été retirée par digestion enzymatique aux sites AgeI et BglII. Une séquence gBlock (Integrated DNA Technologies, IA, USA) contenant les 2 étiquettes hémagglutinine (HA) ainsi que des portions du vecteur pEYFP aux extrémités a été insérée par la méthode d'assemblage de Gibson (New England Biolabs, MA, USA), en position N-terminale par-rapport à la séquence du récepteur NTS2.

Les plasmides rNTS2-YFP/CFP ont été réalisés à partir du même insert que le plasmide précédent, digéré avec les enzymes NheI et AgeI, puis cloné dans les vecteurs pECFP-N1 et pEYFP-N1 (Clontech Laboratories, CA, USA).

Les protéines SgIII fusionnées aux fluorophores YFP ou CFP ont été construites avec un ADNc codant pour la sécrétogranine III entière amplifiée par PCR avec les amorces SgIII sens et antisens (Tableau 5) à partir du vecteur pBluescript (Stratagene, CA, USA) contenant la SgIII de rat de type sauvage. Ce vecteur nous a été aimablement remis par le Dr. Takeuchi de l'*Institute for Molecular and Cellular Regulation* de l'université Gunma à Maebashi, au Japon. Les amorces SgIII contiennent les sites de restriction XhoI et BamHI pour permettre le sous-clonage du segment SgIII dans les vecteurs pECFP-C1 et pEYFP-C1.

La séquence de chaque construction a été confirmée auprès de la plateforme de séquençage et de génotypage des génomes du CRCHUL à Québec avant de procéder à l'utilisation de celles-ci.

**Tableau 5 : Amorces utilisées dans le clonage des différentes constructions**

| Nom            | Séquence   |
|----------------|--|
| NTS2 sens      | 5'- G CTA GCC GCC ACC ATG GAG ACC AGC AGT CCG TGG CCT CC |
| NTS2 antisens  | 5' - CAG TAC CGG TGG TAC TTG TAT TTC TCC CAG GCT GGG     |
| SgIII sens     | 5'- ACT TCT CGA GTT ATG GGG TTC CTT TGG ACA GGC TCT T    |
| SgIII antisens | 5'- TGA AGG ATC CAA CAG GCT GCT GTA GAT GCG TTT GAT G    |

### 2.1.2 Culture cellulaire

Les cellules neuronales murines DRG F11, qui sont des hybridomes produits à partir d'une cellule embryonnaire de DRG de rat et un neuroblastome de souris, nous ont été fournies par le Dr. Fishman (Cardiovascular Research Center, Charlestown, MA, USA). Elles ont été cultivées dans le milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contenant 4,5 g/L de glucose, 584,0 mg/L de L-glutamine et 110,0 mg/L de sodium pyruvate (Wisent, QC, Canada). Le milieu a été supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS) et 100 U/ml de pénicilline/streptomycine (Wisent, QC, Canada). Les cellules étaient maintenues dans un incubateur à 37°C avec une concentration de CO<sub>2</sub> constante de 5% et une atmosphère saturée en eau.

### 2.1.3 Transfections

Les cellules ont été transfectées de façon transitoire à l'aide de l'agent X-tremeGENE HP (Roche, Mannheim, Allemagne). Selon les recommandations de la compagnie, un total de 10 µg d'ADN était ajouté à un Pétri de 10 cm contenant des cellules présentant une confluence entre 70% et 90%. L'ADN plasmidique était formulé à l'agent de transfection selon un ratio de 4:1, soit 40 µl pour 10 µg d'ADN, dans du milieu pauvre en sérum Opti-MEM (Gibco, Burlington, Canada). La formulation était maintenue 15 minutes à température ambiante avant d'être déposée sur les cellules. Les différents essais cellulaires étaient ensuite effectués entre 24h et 48h suivant la transfection.

## 2.2 Analyse de l'interaction NTS2-SgIII dans le modèle cellulaire établi

### 2.2.1 Anticorps

Afin de révéler la protéine NTS2, l'antisérum de lapin dirigé contre la portion N-terminale du récepteur NTS2 a été employé. Cet antisérum artisanal a été caractérisé par l'équipe d'Alain Beaudet (Sarret *et al.*, 2003) et sera référé en tant qu'anti-NTS2. Un

anticorps monoclonal de souris contre l'hémagglutinine (HA) (sc-7392, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) a également été utilisé dans le but de révéler la présence de la construction 2HA-rNTS2. Celui-ci sera nommé anti-HA. Pour identifier la protéine rNTS2-YFP, l'anticorps SC-8334 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) dirigé contre les protéines fluorescentes GFP, CFP et YFP a été utilisé. Cet anticorps polyclonal produit chez le lapin sera référé en tant qu'anti-YFP.

Pour la protéine SgIII, deux anticorps polyclonaux ont été utilisés. Le premier est un anticorps de la gamme prestige de Sigma (HPA006880, Sigma-Aldrich, ON, Canada) produit chez le lapin et référé sous le nom anti-SgIII (lapin). Le second anticorps a été récolté chez la chèvre (sc-1492, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) et sera nommé anti-SgIII (chèvre).

Dans le but de procéder à des analyses quantitatives par immunobuvardage, un anticorps dirigé contre la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase a été utilisé, puisque cette protéine représente un bon standard lorsqu'il est question de préparations membranaires. Cet anticorps polyclonal produit chez le lapin reconnaît l'isoforme  $\alpha$  de la pompe, une protéine de 100 KDa (sc-28800, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

Dans la caractérisation des purifications d'exosomes, un anticorps dirigé contre le marqueur exosomal TSG101 a été employé. Anti-TSG101 est un anticorps monoclonal produit chez la souris (GTX70255, GeneTex, CA, USA).

Dans l'essai GST pull down, un anticorps dirigé contre la glutathion S-transférase (GST) couplé à la peroxidase de raifort (HRP) a été utilisé. Il s'agit d'un anticorps polyclonal de lapin obtenu chez Bethyl Laboratories (A190-122P, Montgomery, TX, USA). Il sera référé à titre d'anti-GST-HRP.

### ***2.2.2 SDS-PAGE et immunobuvardage***

Plusieurs essais d'immunobuvardage ont été expérimentés dans le cadre de ce projet. Premièrement, les gels de polyacrylamide étaient constitués d'un gel séparateur 10% et d'un gel concentrateur de 5%. Avant d'être déposés sur gel, les échantillons étaient suspendus dans le SB4X (0,25 M Tris-HCl pH 6.8, 40% glycérol, 10% (p/v) SDS, 5% (p/v) bleu de bromophénol, 20% DTT 1 M frais) et réchauffés à 37°C pendant 30 minutes. Une quantité maximale de 60  $\mu\text{g}$  de protéines était chargée dans les puits, alors que 7,5  $\mu\text{l}$  du marqueur de poids moléculaire PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA,

USA) étaient déposés sur le gel. La migration s'effectuait dans un tampon d'électrophorèse Tris-Glycine contenant 1% de SDS, à 150 V à température ambiante, pendant environ 1h30.

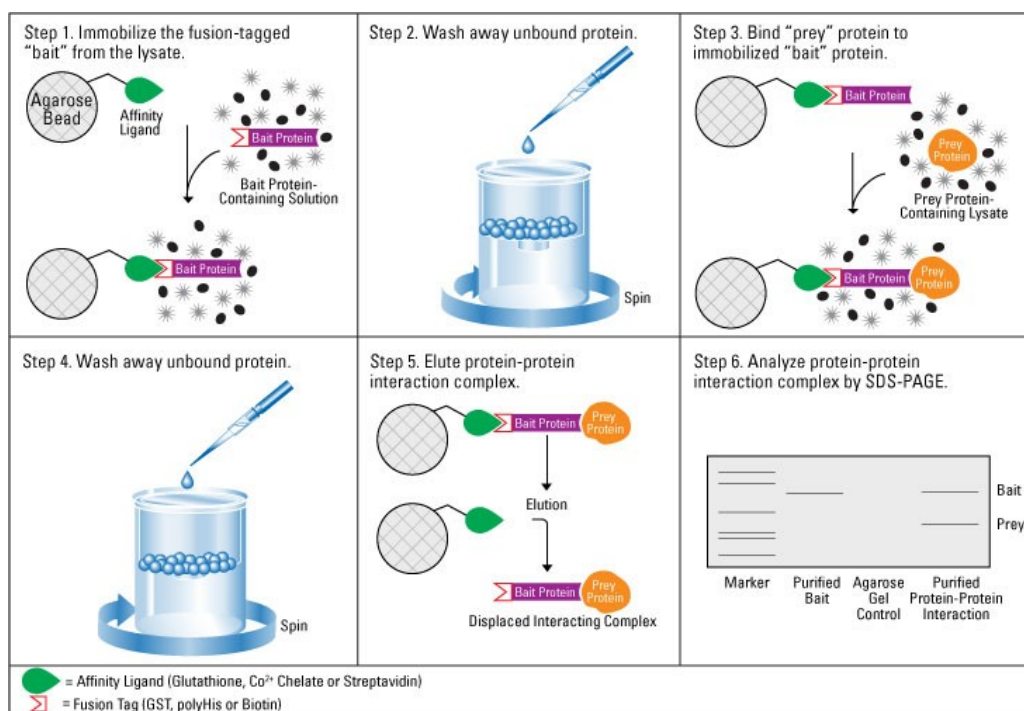
Le transfert des protéines était ensuite effectué sur une membrane de PVDF 0,45 µm (EMD Millipore, Canada) dans un appareil de transfert et du tampon Tris-Glycine, à 200 mA par membrane, pendant 1h30 à température de la pièce.

Afin de bloquer les liaisons non-spécifiques, la membrane de PVDF était ensuite incubée pendant 1h30 dans une solution de TBS-Tween 0,1% dans laquelle était solubilisé 10% (p/v) de lait écrémé en poudre. Suivant cette incubation, la membrane était mise en contact avec l'anticorps primaire pour toute la nuit, à 4°C sous agitation. Les anticorps primaires étaient dilués d'un facteur approprié dans la solution TBS-Tween 0,1% avec 5% (p/v) de lait en poudre. Le lendemain, une série de trois lavages de 10 minutes dans la solution TBS-Tween 0,1% précédait l'incubation de la membrane pendant 1h00 à température ambiante avec l'anticorps secondaire adéquat, dilué dans le TBS-Tween 0,1% avec 5% (p/v) de lait. Enfin, une seconde série de lavages dans le TBS-Tween 1% était suivie de la révélation au ECL, contenant le substrat de la HRP (Amersham ECL Plus, GE Healthcare Life Sciences, ON, Canada). La chimiluminescence a été captée à l'aide des films Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Sciences, ON, Canada) ou avec l'appareil d'imagerie ChemiDoc Touch (Bio-Rad Laboratories, ON, Canada).

Trois anticorps secondaires couplés à la HRP ont été utilisés dans le cadre des essais d'immunobuvardage. Il s'agit de l'anti-chèvre-HRP produit dans l'âne (sc-2056, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), l'anti-souris-HRP produit dans le mouton et l'anti-lapin-HRP produit dans l'âne (NA931V et NA934V, GE Healthcare Life Sciences, ON, Canada). Ces anticorps étaient généralement employés à des dilutions de 1:5000 ou 1:10 000.

### **2.2.3 GST pull down**

Les essais de GST pull down ont été réalisés selon le protocole couramment appliqué dans le laboratoire de Pr Jean-Luc Parent, décrit notamment en 2014 dans *Methods in Molecular Biology : Nuclear G-Protein Coupled Receptors* (Binda & Parent, 2014).



**Figure 22 : Principe général du GST pull down.** (1) La protéine appât fusionnée à la glutathion S-transférase (GST) est immobilisée sur des billes d'agarose couplées au glutathion. (2) On effectue des lavages pour éliminer les protéines non liées aux billes. (3) Un lysat cellulaire contenant la protéine proie est déposé sur les billes d'agaroses liées à la protéine appât. (4) On effectue des lavages pour éliminer les protéines non liées à la protéine appât. (5) Il est possible d'éluer le complexe appât-proie des billes d'agarose. (6) L'interaction protéine-protéine est ensuite analysée par immunobuvardage (Thermo Fisher Scientific). Image libre de droits.

### 2.2.3.1 Clonage de la construction *i3(NTS2)-GST*

La protéine de fusion représentant l'appât pour l'essai GST pull down est constituée de la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur NTS2, c'est-à-dire des acides aminés 231 à 294 de la protéine entière de rat. Cette portion a été amplifiée à l'aide des amorces sens (5'-ACT TGT GGA TCC ATG GCC CTC TAC TCC CAG GTA -3') et antisens (5'-CGT TTG CTC GAG CTG GCT GGC ATC CTT GTG TCT-3') à partir du vecteur rNTS2-CFP. L'insert et le vecteur pGEX-4T3 (GE Healthcare Life Sciences, ON, Canada) ont ensuite été digérés avec les enzymes BamHI et XhoI pour permettre le clonage. La construction a finalement été envoyée à la plateforme de séquençage et de génotypage des génomes du CR-CHUL à Québec avant d'être utilisée.

### 2.2.3.2 Essai GST pull down

Une sous-culture des bactéries productrices BL21 ou C41 transformées avec la protéine de fusion i3(NTS2)-GST a été effectuée dans 4 ml de milieu LB en présence de carbénicilline (Gold Biotechnology, MO, USA), un analogue de l'ampicilline. Cette sous-culture a été incubée à 37°C pendant toute la nuit, sous agitation.

Le lendemain, une culture de 100 ml de LB avec carbénicilline a été inoculée avec 2 ml de la sous-culture. La culture a alors été incubée à 37°C sous agitation jusqu'à une  $DO_{595nm}$  entre 0,6 et 0,8. Une fois cette DO atteinte, la culture a été déposée sur glace pendant 10 minutes, puis induite en présence de 0,2 mM d'IPTG pendant 3h00 à 37°C. Ensuite, le culot bactérien a été récupéré par centrifugation et repris dans le tampon A (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8.0, 10% glycérol, 0,5% IGEPAL, 1/500 CLAP). Après deux cycles de gel à -80°C et dégel à température ambiante, les échantillons ont été incubés 30 minutes à 4°C avec 1 mg/ml de lysozyme, puis soniqués. Entre temps, les billes glutathion-sépharose 4B (GE Healthcare Life Sciences, ON, Canada) ont été lavées à trois reprises avec du PBS 1X auquel 10 mg/ml de BSA avait été ajouté. Les billes ont ensuite été combinées aux échantillons de la protéine de fusion à raison de 100 µl de billes pour 100 ml de culture de départ, puis incubées avec rotation pendant 1h00 à 4°C. Après une série de 5 lavages dans le tampon A, les billes étaient congelées dans le tampon A avec 30% glycérol ou conservées à 4°C pour la poursuite du protocole.

Les billes ont été déposées sur gel SDS-PAGE 10% après une incubation à 95°C pendant 5 minutes dans le tampon de chargement SB4X. Une coloration au bleu de Coomassie (40% MeOH, 10% CH<sub>3</sub>COOH, 0,25% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250) pendant 30 minutes, suivie de lavages dans le tampon de décoloration (40% MeOH, 10% CH<sub>3</sub>COOH), permettait de confirmer la présence de la protéine appât de fusion i3(NTS2)-GST sur les billes.

Dans le cas d'un résultat favorable sur le gel révélé par le bleu de Coomassie, l'essai était poursuivi avec l'incubation des billes i3(NTS2)-GST en présence du lysat protéique contenant la seconde protéine dite proie. Ce lysat a été obtenu à partir de cellules DRG F11 exprimant la protéine SgIII de façon endogène,ensemencées sur des Pétris de 10 cm. Au-moment du prélèvement, les cellules étaient d'abord lavées à deux reprises au PBS 1X froid, puis grattées en présence de 1 ml de tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 1% IGEPAL, 0,5% Na-deoxylate, 0,1% SDS) supplémenté avec des

inhibiteurs de protéases (Complete EDTA-free, Roche, Mannheim, Allemagne). Après sonication sur glace, les échantillons étaient centrifugés à 15 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant était finalement conservé, puis dosé à l'aide de la méthode BCA (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) pour en évaluer la concentration protéique.

Une quantité de 5 µg de protéines de fusion i3(NTS2)-GST couplées aux billes ont donc été incubées avec 5 µg de la seconde protéine dans un volume final de 200 µl de tampon A + 1 mM DTT à 4°C sous agitation toute la nuit.

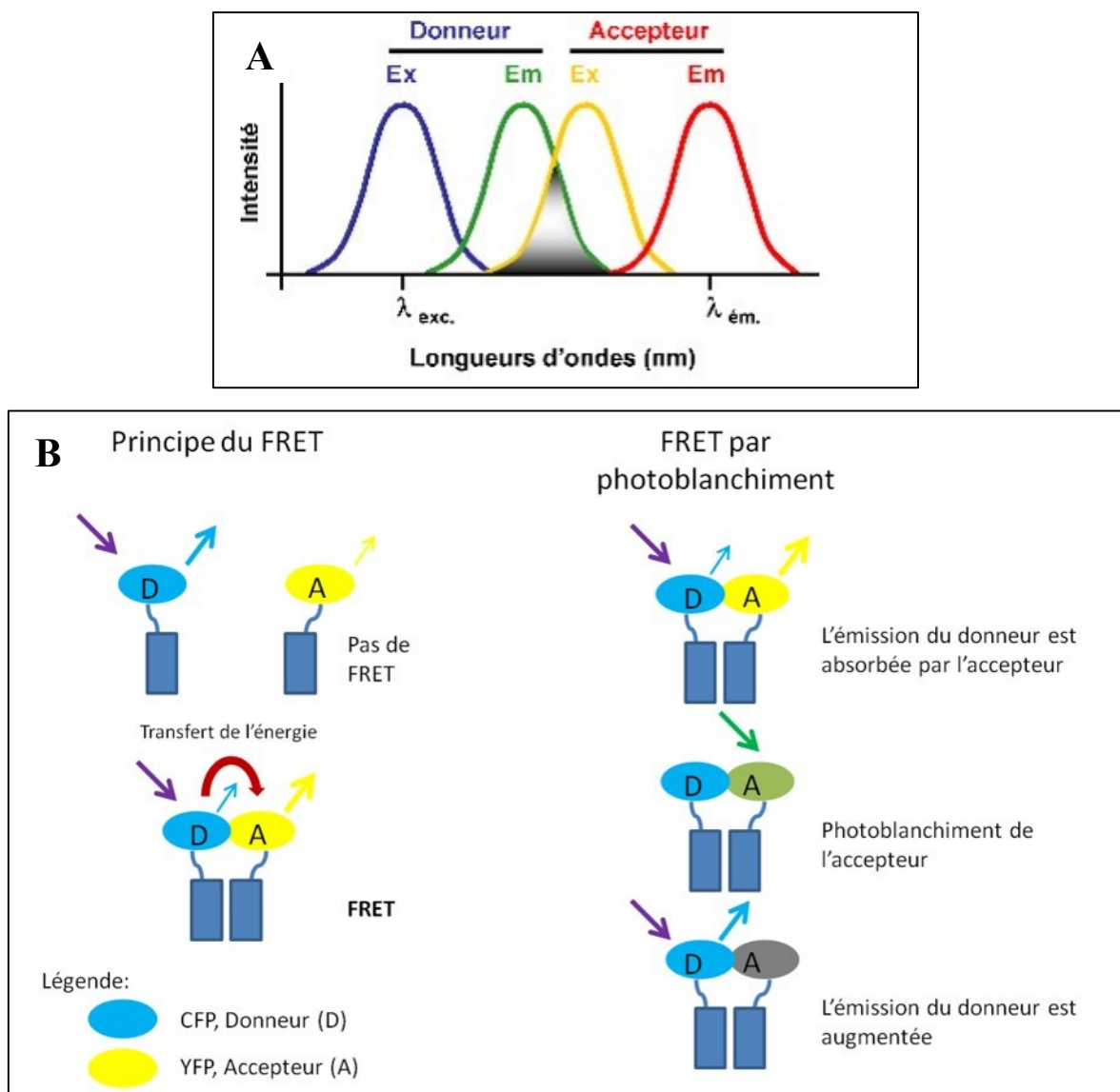
Le lendemain, 20 µl du surnageant du pull down était récolté à titre de contrôle avant de procéder au lavage des billes à trois reprises dans le tampon A + 1 mM DTT. Enfin, 40 µl de SB4X était ajouté aux billes avant de procéder à la migration sur SDS-PAGE et à l'immunobuvardage tel que décrit dans la section précédente.

Dans le but de révéler la présence de la construction i3(NTS2)-GST dans l'immunobuvardage, l'anticorps anti-GST-HRP a été utilisé à une dilution 1:10 000. Pour révéler la protéine SgIII, c'est l'anti-SgIII de chèvre qui fût employé à une dilution de 1:5000, en plus de l'anticorps secondaire anti-chèvre couplé à la HRP à une dilution de 1:5000.

#### **2.2.4 FRET**

L'essai FRET, ou transfert d'énergie par molécules fluorescentes, permet de vérifier l'interaction entre deux protéines, considérant que celles-ci ne peuvent s'échanger de l'énergie que lorsqu'elles sont suffisamment rapprochées l'une de l'autre. L'expérimentation a été réalisée selon le protocole de Karpova et McNally, qui décrit la méthode de FRET avec le couple de fluorophores CFP-YFP en condition de photoblanchiment de l'accepteur (Karpova & McNally, 2006).





**Figure 23 : Principe du FRET.** (A) L'essai de FRET repose sur le principe que les spectres d'émission et d'excitation de certains fluorophores se superposent. (B) C'est le cas notamment du couple CFP-YFP, où le CFP, une fois excité, peut donner une partie de son énergie d'émission au YFP si celui-ci se trouve assez près et dans une orientation adéquate. En photoblanchissant l'accepteur (YFP), le donneur (CFP) arrêtera alors de perdre une partie de son énergie d'émission, et verra donc son signal d'émission augmenté. Cette augmentation d'émission du donneur post-photoblanchiment témoigne d'une grande proximité entre les deux protéines (Jares-Erijman & Jovin, 2003). Reproduit avec permission.

Les cellules DRG F11 ont d'abord étéensemencées 25 000 cellules par puits dans les  $\mu$ -lames à 8 puits à fond de verre conçues pour l'observation en microscopie confocale (IBIDI, WI, USA). Plusieurs transfections ont été réalisées, énumérées dans le tableau 6.

**Tableau 6 : Transfections effectuées pour l'essai FRET**

| # Puits | Constructions           | Ratio | ADN                | X-tremeGENE HP | Opti-MEM | Volume/puits |
|---------|-------------------------|-------|--------------------|----------------|----------|--------------|
| 1       | PeYFP-C1<br>PeCFP-C1    | 1:4   | 0,15 µg<br>0,15 µg | 1,2 µl         | 30 µl    | 30 µl        |
| 2       | Contrôle +              | 1:4   | 0,3 µg             | 1,2 µl         | 30 µl    | 30 µl        |
| 3       | CFP-rSgIII              | 1:4   | 0,15 µg            | 0,6 µl         | 30 µl    | 30 µl        |
| 4       | YFP-rSgIII              | 1:4   | 0,15 µg            | 0,6 µl         | 30 µl    | 30 µl        |
| 5       | rNTS2-CFP               | 1:4   | 0,15 µg            | 0,6 µl         | 30 µl    | 30 µl        |
| 6       | rNTS2-YFP               | 1:4   | 0,15 µg            | 0,6 µl         | 30 µl    | 30 µl        |
| 7       | rNTS2-YFP<br>CFP-rSgIII | 1:4   | 0,15 µg<br>0,15 µg | 1,2 µl         | 30 µl    | 30 µl        |
| 8       | rNTS2-CFP<br>YFP-rSgIII | 1:4   | 0,15 µg<br>0,15 µg | 1,2 µl         | 30 µl    | 30 µl        |

Dans le puits #1, les vecteurs PeYFP-C1 et PeCFP-C1 ont été co-transfectés dans le but de représenter un contrôle négatif, car les deux fluorophores ne devraient pas interagir. Dans le puits #2, il s'agit d'un contrôle positif où les deux fluorophores se retrouvent fusionnés sur la même protéine (CFP-YFP) et séparés de 16 acides aminés. Cette construction a été réalisée tel que décrit par Hoppe et collaborateurs en 2002 dans *Biophysical Journal*. Dans ce cas, les deux fluorophores devraient être suffisamment près l'un de l'autre pour s'échanger de l'énergie. Dans les puits #3 à #6, les constructions CFP/YFP-rSgIII et rNTS2-CFP/YFP ont été transfectées de façon individuelle afin de régler les paramètres du microscope confocal (Olympus IX81, NY, USA) sur l'émission des fluorophores dans des conditions où il n'y avait pas d'échange d'énergie. Dans les puits #7 et #8, les co-transfections des protéines CFP/YFP-rSgIII et rNTS2-CFP/YFP ont été effectuées dans le but de vérifier s'il y avait interaction entre NTS2 et SgIII.

Le lendemain de la transfection, le milieu était retiré pour procéder au lavage des cellules avec du PBS 1X froid. Celles-ci étaient ensuite fixées pendant 10 minutes avec du paraformaldéhyde (PFA) dilué à 4% dans le PBS. Suivant un second rinçage au PBS, les échantillons ont été bloqués pendant 5 minutes dans 100 mM de glycine afin de réduire l'autofluorescence. Après un dernier lavage au PBS, une préparation de 80% glycérol avec PBS a été déposée sur les cellules pour les conserver à long terme à 4°C.

À l'aide du logiciel Fluoview FV1000 (Olympus, NY, USA), des cellules individuelles ont été sélectionnées sous l'objectif 60X afin de procéder aux essais FRET. Le laser argon

(458, 488 et 515 nm) a été utilisé afin d'exciter le CFP à une longueur d'onde de 458 nm et le YFP à 515 nm. Ces fluorophores émettent respectivement à des longueurs d'onde de 480 nm et 527 nm. Un assistant logiciel a permis de sélectionner les paramètres optimaux pour l'essai FRET, en effectuant un photoblanchiment de l'accepteur pour 10 cycles avec une puissance de 100% du laser de 515 nm. Le logiciel nous donnait alors, pour chacun des canaux, une image pré-photoblanchiment, une image post-photoblanchiment, une image représentant la différence avant-après et une image d'efficacité FRET calculée pour chaque pixel selon la formule suivante :

$$\text{Efficacité FRET (\%)} = 1 - \frac{\text{Émission du donneur avant photoblanchiment}}{\text{Émission du donneur après photoblanchiment}} \times 100$$

Un résultat d'efficacité FRET qui tend vers 100% représente une bonne interaction entre les deux fluorophores.

## **2.2.5 Vérification du modèle d'interaction impliquant les corps multi-vésiculaires**

### **2.2.5.1 Purification des exosomes**

Pour purifier les exosomes du surnageant de cellules, la méthode classiquement favorisée est celle de l'ultracentrifugation. L'expérimentation effectuée s'est donc inspirée du protocole présenté par Théry et collaborateurs en 2006 dans *Current Protocols in Cell Biology*.

Des cellules DRG F11 ensemencées dans des Pétris de 15 cm ont d'abord été transfectées avec la construction 2HA-rNTS2. Des cellules non transfectées ont également été suivies en parallèle afin de servir de contrôle négatif. Après 48 heures d'incubation, le milieu conditionné des cellules a été récolté dans des tubes de 50 ml pour être centrifugé 20 minutes à 2 000 x g dans une petite centrifugeuse de table (IEC Centra CL2, Thermo Electron Corporation, MA, USA). Le surnageant était ensuite récupéré dans des tubes de 50 ml de copolymère de polypropylène (Nalgene Oak Ridge, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) et centrifugé à 10 000 x g à 4°C pendant 30 minutes avec le rotor Fiberlite F21-8x50y dans la centrifugeuse Sorvall LYNX 6000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Le surnageant était à nouveau récupéré dans un tube de polytéréphtalate d'éthylène de 36 ml compatible avec le rotor SureSpin 630 de l'ultracentrifugeuse Sorvall WX (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Celui-ci était soumis à une centrifugation de 100 000 x g, à 4°C pendant 70 minutes,

au terme de laquelle le surnageant était jeté et le culot repris dans du PBS. L'échantillon était ultracentrifugé une seconde fois à 100 000 x g, à 4°C pendant 60 minutes. Le surnageant était finalement jeté, alors que le culot était repris dans 200 µl de PBS ou de SB4X pour procéder à la migration sur SDS-PAGE.

## **2.2.6 Imagerie cellulaire**

### *2.2.6.1 Immunofluorescence*

Pour observer les cellules DRG F11 en microscopie par épifluorescence ou en microscopie confocale, celles-ci ont été fixées au PFA 4% tel que décrit précédemment. Après rinçage au PBS, elles ont été perméabilisées à l'aide d'une solution de 0,2% Triton X-100 pendant 5 minutes, puis rincées au PBS à nouveau. L'autofluorescence a été réduite en appliquant 100 mM de glycine sur les cellules pendant 5 minutes. Suivant un lavage au PBS, les sites non-spécifiques ont été bloqués pendant 30 minutes avec une solution de 2% BSA dans le PBS. Ensuite, l'anticorps primaire dilué 1:200 dans le PBS 2% BSA était déposé sur les cellules pendant 1h00. Après deux lavages de 5 minutes dans le PBS, les cellules étaient mises en contact avec l'anticorps secondaire approprié couplé à un fluorophore, dilué 1:500 dans le PBS 2% BSA, pendant 30 à 45 minutes à l'abri de la lumière. Une seconde série de lavages dans le PBS a précédé le montage des échantillons dans le ProLong Gold Antifade Reagent contenant du DAPI (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Comme anticorps secondaires, différentes combinaisons d'espèces et de fluorophores ont été utilisées. Pour visualiser la protéine SgIII, l'anti-lapin Alexa Fluor 633 dirigé contre l'anti-SgIII (lapin) a principalement été employé, alors que le marquage de la protéine 2HA-rNTS2 s'est effectué à l'aide de l'anti-souris Alexa Fluor 594, reconnaissant l'anti-HA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

### *2.2.6.2 Imagerie en épifluorescence*

Le microscope droit à fluorescence Leica DM4000 a été utilisé de pair avec la caméra Leica DFC350FX (Leica Microsystems, ON, Canada) afin d'observer les échantillons cellulaires en épifluorescence. Les filtres A4 (400 nm), L5 (505 nm), TX2 (595 nm) et Y5 (660 nm), ainsi que le logiciel Photoshop (Adobe Systems, SJ, USA) ont servi à l'acquisition et l'analyse des images.

### 2.2.6.3 *Imagerie confocale et essai de colocalisation*

Le microscope confocal à balayage laser Olympus IX81 ainsi que son logiciel Fluoview FV1000 (Olympus, NY, USA) ont été utilisés afin de procéder à l'acquisition et l'analyse des images confocales ainsi qu'aux essais de colocalisation cellulaire. Les lasers diode (405 nm), argon (458, 488 et 515 nm), hélium (543 nm) et diode (635 nm) étaient à disposition pour permettre l'excitation des différents fluorophores employés.

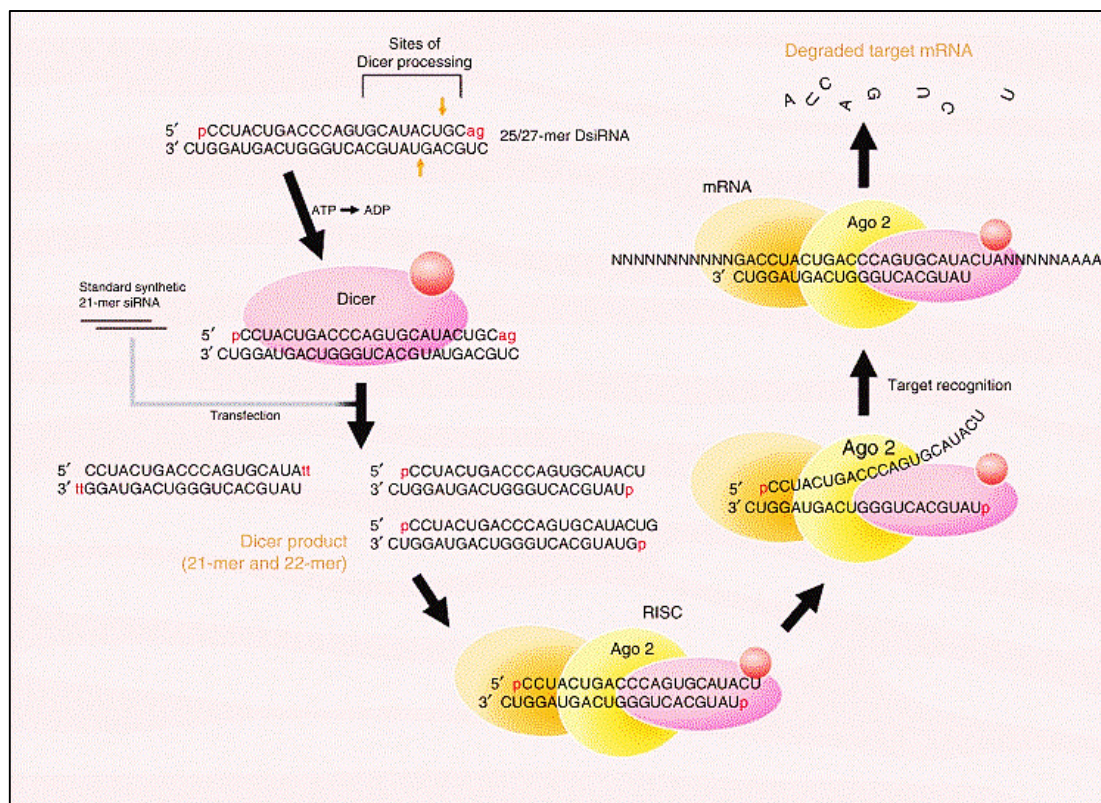
Le microscope confocal TCS SP8 STED 3X (Leica Microsystems, ON, Canada) accompagné du logiciel LAS AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence) a aussi permis l'acquisition de certaines images présentées dans le cadre de ce mémoire.

Des analyses subséquentes des images ont également été réalisées à l'aide du logiciel Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

## 2.3 **Modulation de l'interaction NTS2-SgIII dans le modèle cellulaire**

### 2.3.1 *Utilisation des Dicer-substrate siRNAs*

L'interférence à l'ARN représente une méthode simple et efficace pour invalider transitoirement l'expression de l'ARN messenger d'une protéine cible, autant *in vitro* que *in vivo* (Genc *et al.*, 2004). L'utilisation de petits ARN interférents (siRNA) double-brin modifiés pour contenir le site de clivage de la protéine Dicer (Dicer-substrate siRNA – DsiRNA) démontre une plus grande efficacité d'entrée dans le complexe RISC, ce qui augmente le rendement de dégradation de l'ARNm cible (Figure 24).



**Figure 24 : Traitement des Dicer-substrate small interfering RNAs (DsiRNAs) dans les cellules eucaryotes.** Après captage des DsiRNAs de 25 à 27-mer par la cellule, ceux-ci sont clivés en siRNA de 21-mer par la protéine Dicer. Cette association avec la protéine Dicer facilite l'entrée des séquences nucléotidiques dans le *RNA-induced silencing complex* (RISC). Lors de l'assemblage du complexe RISC, un des deux brins d'ARN, référé à titre de brin passager, est clivé et relâché, alors que le second brin (brin guide) est incorporé dans la protéine argonaute Ago2, composante du complexe RISC. Ce brin guide permet la reconnaissance de l'ARNm qui lui est complémentaire, qui sera finalement clivé par l'activité endonucléase d'Ago2 (Doré-Savard *et al.*, 2008). Reproduit avec permission.

### 2.3.1.1 Synthèse et caractérisation des DsiRNAs

Les DsiRNAs ont été synthétisés par la compagnie IDT (Integrated DNA Technologies, IA, USA) et caractérisés dans les cellules Neuro2a et PC12, tel que décrit précédemment (Lemire, 2013). Le tableau 7 présente les séquences retenues pour être utilisées dans le contexte de ce mémoire. La séquence référée à titre de SgIII 1890 est dirigée contre l'ARNm de SgIII de *rattus norvegicus* et *mus musculus*, alors que la séquence nommée NC1 est un contrôle négatif qui n'a aucune cible cellulaire. Nous avons également utilisé un DsiRNA contrôle couplé au fluorophore Texas Red (séquence non montrée) afin de confirmer le captage des molécules interférentes par les tissus cibles.

**Tableau 7 : Séquences des DsiRNAs utilisés dans le projet**

| Nom        | Séquence  |
|------------|---|
| SgIII 1890 | 5'- AGUUAUCCCUUAGAAAUGAGUAaa<br>3'- CAUCAAUUAGGGAAUCUUUACUCAUUU |
| NC1        | 5' CGUUAUUCGCGUAUAAUACGCGUat<br>3' CAGCAAUUAGCGCAUAUUAUGCGCAUA  |

Les majuscules représentent des résidus ribonucléiques, alors que les minuscules sont des résidus désoxyribonucléiques.

### 2.3.1.2 Transfection des DsiRNAs dans les cellules DRG F11

Les DsiRNAs ont été délivrés dans les cellules DRG F11 à l'aide de l'agent Viromer Green (Lipocalyx, Allemagne). Selon les recommandations de la compagnie, les DsiRNAs à une concentration de 11  $\mu$ M étaient formulés à l'agent de transfection dilué 1:100 dans le tampon F fourni par la compagnie. Après 5 à 10 minutes à température pièce, le mélange était déposé sur les cellules.

L'efficacité d'invalidation de l'ARN messager et de la protéine SgIII dans les cellules DRG F11 a été évaluée à l'aide des techniques de PCR quantitatif (qPCR), d'immunobuvardage (IB) ainsi que d'immunofluorescence (IF).

### 2.3.1.3 Vérification de l'efficacité des DsiRNAs dans les cellules DRG F11

Afin de quantifier les niveaux d'ARNm exprimés dans les cellules DRG F11 suite au traitement par les DsiRNAs, la technique de PCR quantitative (qPCR) a été utilisée. L'ARN total a d'abord été extrait des cellules à l'aide de la trousse RNeasy Mini (Qiagen, MD, USA) selon le protocole recommandé par le manufacturier, puis dosé au spectrophotomètre (NanoDrop ND1000, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). L'ADN complémentaire (ADNc) a été synthétisé à partir de 1  $\mu$ g d'ARN avec le kit de transcription inverse QuantiTect (Qiagen, MD, USA) et du thermocycleur T100 (Bio-Rad Laboratories, ON, Canada). L'ADNc obtenu était ensuite dilué 1:5 pour procéder à la préparation pour la PCR quantitative, où 1  $\mu$ l de chaque échantillon était mélangé à 1  $\mu$ M d'amorces sens et antisens, 10,5  $\mu$ l d'eau et 12,5  $\mu$ l de SensiFAST SYBR (Bioline, FroggaBio, ON, Canada). Le logiciel Rotor-Gene 6 a permis de régler l'appareil de qPCR Rotor-Gene 3000A (Corbett, USA) pour effectuer une première étape de maintien à 95°C pendant 10 minutes, suivie de 40 cycles de 95°C pendant 15 secondes, 55°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 45 secondes. Les gènes de référence choisis pour standardiser les données étaient HPRT et ODC et les

différentes paires d'amorces utilisées au cours du projet sont présentées dans le tableau 8. Les résultats bruts obtenus ont été transformés par la méthode de  $\Delta\Delta C_t$  afin de représenter des niveaux d'expression relatifs entre les conditions (Livak & Schmittgen, 2001).

**Tableau 8 : Paires d'amorces utilisées pour la PCR quantitative**

| Cible | Séquence  |
|-------|---|
| SgIII | 5'-GAGTACGATTCCACCAAGAGTG<br>5'-GCAGTTAAAGGAGTTCCATCCA    |
| NTS2  | 5'-CCCGATGATGGATGGACTAATG-3'<br>5'-AAGACACGGCGTTGTAGAG-3' |
| HPRT  | 5'-CAAACCTTTGCTTTCCCTGGT<br>5'-CAACAAAGTCTGGCCTGTATC      |
| ODC   | 5'-TGACATTGGTGGTGGCTTTC<br>5'-GCTCAGCTATGATTCTCACTCC      |

L'efficacité d'invalidation des DsiRNAs sur les niveaux d'expression de la protéine SgIII a été évaluée à l'aide des approches d'immunobuvardage et d'immunofluorescence décrites dans les sections précédentes.

### **2.3.2 Essais de radioliation**

Des essais de liaison effectués avec de la neurotensine (NT1-13) couplée à l'iode radioactif (PerkinElmer, MA, USA) ont permis de déterminer les capacités du récepteur NTS2 à reconnaître son ligand endogène dans les cellules DRG F11 transfectées avec les différentes constructions du récepteur. Cette technique nous a notamment permis de déterminer l'effet de différentes conditions (invalidation de SgIII, stimulations au KCl, capsaïcine et neurotensine) sur la présence membranaire du récepteur.

#### **2.3.2.1 Radioliation sur membranes**

Des préparations de membranes des cellules DRG F11 ont été réalisées en grattant d'abord les cellules dans 1 ml de 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 froid. Après une centrifugation à 15 000 x g pendant 5 minutes à 4°C, le surnageant était retiré et le culot repris dans 1 ml de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) pour être soniqué pendant 10-15 secondes sur glace. Une seconde centrifugation à 15 000 x g pendant 30 minutes à 4°C permettait de récupérer le culot à nouveau et de le reprendre dans 500 µl de 50 mM Tris-HCl, pH 7.5.



Le contenu protéique de la préparation membranaire était évalué de façon approximative à l'aide du Nano-Drop, afin d'ajouter 50 µg de membranes à 300 000 CPM (0,35 nM) de neurotensine iodée. Pour évaluer les liaisons non spécifiques, un excès de ligand froid (10 µM de NT8-13) était ajouté aux répliques de chaque échantillon. Après une incubation de 30 minutes à température de la pièce, les échantillons étaient déposés sur des filtres ronds en microfibre de verre de 24 mm pré-incubés dans du polyéthylènimine 0,5% (Whatman, Sigma-Aldrich, MO, USA) pour être lavés à trois reprises dans le tampon de radioliation (50 mM Tris-HCl, 0,2% BSA pH 7.5) à l'aide d'un système d'aspiration spécialisé. Les filtres étaient finalement déposés au fond de tubes de polystyrène (Fisher Scientific, ON, Canada) pour effectuer la lecture dans un compteur Gamma automatique (Wizard2, PerkinElmer, MA, USA).

### 2.3.2.2 Radioliation sur cellules entières

Les essais de radioliation sur cellules entières ont été effectués en condition de saturation selon le protocole décrit par Sarret et collaborateurs en 2004 dans *Journal of Biological Chemistry*.

En bref, les cellules DRG F11 ont étéensemencées 100 000 cellules par puit dans des plaques de 24 puits prétraitées à la poly-l-lysine (Sigma-Aldrich, ON, Canada). Le lendemain, les cellules étaient pré-incubées 10 minutes à 37°C dans le tampon Earle's (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,9 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES pH 7.4) supplémenté avec 1% de BSA et 0,1% de glucose avant d'ajouter la neurotensine iodée diluée en série, de 250 000 CPM à 1950 CPM, sur 8 échantillons en triplicata. Une dilution isotopique effectuée à l'aide de neurotensine non radioactive a permis d'ajuster l'activité spécifique à un maximum de 50 Ci/mmol, soit plus ou moins 20 nM de ligand total. Une concentration de 1 µM de NT 8-13 non radioactive était ajoutée au 3<sup>e</sup> réplica afin de déplacer le ligand radioactif et d'enregistrer le niveau d'activité non spécifique. Après 30 minutes d'incubation, les échantillons étaient lavés à deux reprises dans le tampon Earle's, puis décollés de la plaque avec 200 µl de NaOH 0,1 N. Ceux-ci étaient finalement déposés dans les tubes de lecture en polystyrène compatibles avec le compteur Gamma automatique.

En parallèle de l'essai de radioliation, une seconde plaque de 24 puits permettait de doser la concentration protéique des échantillons à l'aide de la méthode BCA, dans le but

d'exprimer les valeurs obtenues en fmol de neurotensine radioactive retenue par mg de protéines totales.

### 2.3.2.3 Radioliation sur exosomes

Les préparations exosomales, réalisées tel que décrit précédemment, ont été incubées pendant 30 minutes avec 300 000 CPM de neurotensine iodée. Elles étaient ensuite déposées sur des filtres de polycarbonate de 0,05  $\mu\text{m}$  d'un diamètre de 25 mm (Sterlitech Corporation, WA, USA) pré-incubés dans le tampon de radioliation (50 mM Tris-HCl, 0,2% BSA pH 7.5). Ces filtres étaient superposés sur des filtres classiques en microfibre de verre de 24 mm et placés dans un système de filtration individuel. Après un lavage au tampon de radioliation, les filtres de polycarbonate étaient récupérés dans des tubes de lecture en polystyrène compatibles avec le compteur Gamma automatique. Les cellules desquelles le surnageant avait été prélevé pour l'extraction des exosomes ont été comptées, dans le but d'exprimer les données de radioliation en termes de radioactivité retenue par-rapport au nombre de cellulesensemencées dans les Pétris.

### 2.3.3 Stimulation cellulaire

#### 2.3.3.1 Stimulation à la neurotensine 8-13

Après 8 heures d'ensemencement des cellules, le milieu DMEM complet était remplacé par du DMEM sans sérum. La neurotensine 8-13 préparée dans du PBS en présence de 0,8 mM de 1,10-phenanthroline, un inhibiteur de protéases, était ajoutée au milieu des cellules jusqu'au lendemain, à raison d'une concentration finale de 1  $\mu\text{M}$  par puit. Ce temps d'incubation et cette dose ont été choisis en fonction de la figure 12, qui démontre une présence maximale du récepteur NTS2 à la membrane après 24 heures de stimulation à la neurotensine (Perron *et al.*, 2006).

#### 2.3.3.2 Stimulation au KCl

Le milieu DMEM complet était remplacé par une solution riche en KCl (NaCl 119 mM, KCl 25 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM, glucose 10 mM, HEPES 10 mM). Le KCl était laissé sur les cellules pour une période de 30 minutes avant d'être retiré (Hobo *et al.*, 2011).

### 2.3.3.3 *Stimulation à la capsaïcine*

La capsaïcine (Sigma-Aldrich, ON, Canada) était d'abord préparée à une concentration de 1 mM dans l'éthanol. Celle-ci était ensuite diluée dans le milieu DMEM sans sérum afin d'atteindre une concentration finale de 1  $\mu$ M de capsaïcine et de 0,1% d'éthanol (Cavanaugh *et al.*, 2011). Ce milieu sans sérum contenant 1  $\mu$ M de capsaïcine était ajouté aux cellules à raison de 500  $\mu$ l par puits, après que le milieu de maintien ait été retiré. Au terme de 30 minutes d'incubation, le milieu était retiré pour procéder aux essais subséquents.

## 2.4 **Modulation de l'interaction NTS2-SgIII dans un modèle de douleur aiguë chez le rat**

### 2.4.1 *Le modèle de douleur aiguë chez le rat*

Afin de caractériser la douleur aiguë chez l'animal, le test comportemental utilisé au laboratoire est le test de retrait de la queue, décrit notamment par Sarret et collaborateurs en 2005 dans *Journal of Neuroscience*. Pour obtenir une force statistique appropriée à ce test, les groupes expérimentaux étaient constitués de 6 à 8 individus. Aussi, les expérimentations animales présentées dans ce mémoire étaient approuvées par le Comité institutionnel de protection des animaux de l'Université de Sherbrooke, en plus de répondre aux exigences du Conseil canadien de protection des animaux.

#### 2.4.1.1 *Hébergement des animaux*

Les rats Sprague-Dawley mâles adultes (250-300 g, Charles River, QC, Canada) étaient hébergés sous un cycle lumière/noirceur de 12 heures et avaient un accès illimité à de la nourriture et de l'eau fraîche.

#### 2.4.1.2 *Acclimatation*

Les rats étaient d'abord acclimatés à leur environnement de l'animalerie centrale pendant une semaine avant de procéder à la manipulation. Ils étaient ensuite individuellement acclimatés à la contention dans la serviette, au bruit de l'appareil, au contact de la queue avec de l'eau à température ambiante, pour une période de 3 jours consécutifs avant de procéder à l'essai comportemental.

### 2.4.1.3 *Le test de retrait de la queue*

Le test de retrait de la queue consiste à immerger environ 5 cm du bout de la queue de l'animal dans un bain d'eau chaude à 52°C et à chronométrer le temps nécessaire pour observer un réflexe de retrait. Ce test a été réalisé à l'aide de l'appareil Tail-flick de Bioseb (FL, USA). Le temps chronométré est exprimé en secondes et référé à titre de temps de latence. Le temps de latence maximal (*cut-off*) était fixé à 10 secondes. Les animaux sont testés une première fois pour obtenir une valeur basale du temps de latence. Après injection des composés, les animaux sont à nouveau testés à chaque intervalle de 10 minutes, pendant 60 minutes. Enfin, l'analyse des résultats est effectuée en traduisant les temps de latence en termes de pourcentage d'effet maximal possible (% MPE) selon la formule suivante :

$$\% \text{ MPE} = \frac{\text{Temps de latence} - \text{Valeur basale (temps 0)}}{\text{Valeur maximale (10 secondes)} - \text{Valeur basale (temps 0)}} \times 100$$

### 2.4.1.4 *Protocole d'injection des DsiRNAs*

Les DsiRNAs étaient formulés 1:15 à l'agent de transfection Transductine (Integrated DNA Technologies, IA, USA), soit 5 µg de DsiRNA (1,5 µl) et 75 µg de Transductine (22,5 µl) par animal. Le mélange était conservé sur glace pendant 40 minutes avant de procéder à l'injection. Cette injection était effectuée par voie intrathécale, entre les vertèbres L5 et L6, chez l'animal légèrement anesthésié à l'isoflurane (Abbott Laboratories, Montreal, QC, Canada). Une aiguille 27G x 1/2 (Becton Dickinson, ON, Canada) montée sur une seringue Hamilton de 50 µl (Dutscher, France) était utilisée pour effectuer l'injection. L'administration des DsiRNAs s'effectuait à raison de deux doses espacées d'une journée, 48h et 24h avant de procéder au test comportemental (Figure 25).

### 2.4.1.5 *Protocole d'injection des composés analgésiques*

Les différents composés analgésiques ont été injectés par voie intrathécale, au moment de procéder au test de retrait de la queue.

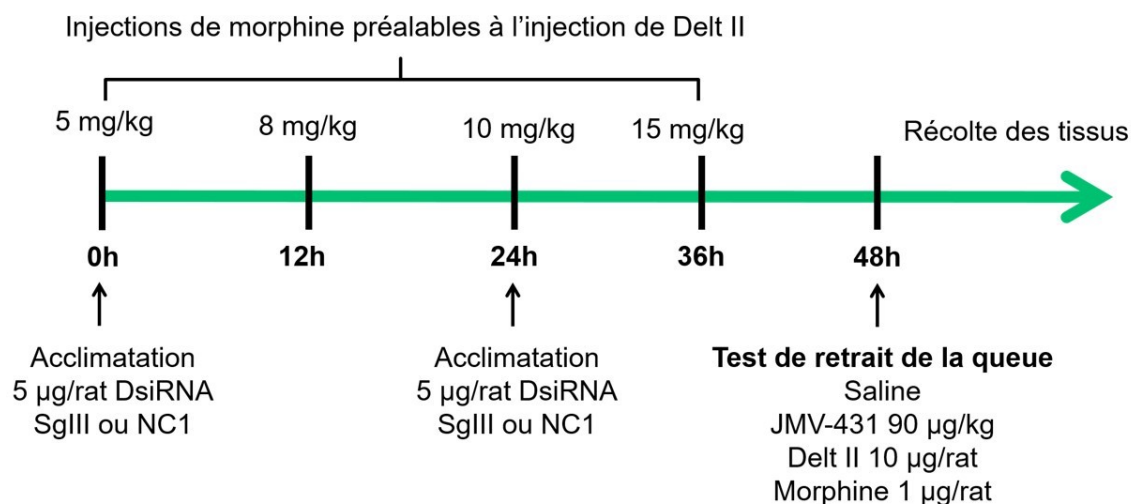
Le JMV-431, un agoniste NTS2-sélectif, a été administré à une dose de 90 µg/kg chez l'animal dans un volume de 25 µl de saline stérile 0,9% (Dufort et Lavigne, QC, Canada).

La deltorphine II (Delt II), un agoniste sélectif du récepteur opioïde δ, était injectée à une dose de 10 µg/rat dans un volume de 25 µl de saline. Afin d'obtenir un effet analgésique de la Delt II, le système devait être pré-stimulé par des injections sous-cutanées à doses

croissantes de morphine, effectuées à quatre reprises espacées de 12 heures (Cahill *et al.*, 2001; Gendron *et al.*, 2007).

La morphine, agoniste du récepteur opioïde  $\mu$  majoritairement, était injectée à une dose de 1  $\mu\text{g}/\text{rat}$  dans un volume de 25  $\mu\text{l}$  de saline.

Un volume de 25  $\mu\text{l}$  de saline était injecté par voie intrathécale pour servir de contrôle non analgésique.



**Figure 25 : Protocole expérimental du test de retrait de la queue.**

#### 2.4.1.6 Récolte et analyse moléculaire des tissus

Au terme des essais comportementaux, la moelle épinière ainsi que les DRG L1 à L6 étaient récoltés des animaux sacrifiés.

Pour récupérer les tissus à des fins d'analyse de l'ARNm et de l'expression protéique, les animaux étaient euthanasiés par décapitation à l'aide d'une guillotine, alors qu'ils étaient profondément anesthésiés à l'isofluorane. Pour en extraire l'ARN, les tissus étaient immergés dans une solution de stabilisation (RNAlater, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) et conservés à 4°C. Pour l'extraction protéique, les tissus étaient refroidis rapidement (*snap freeze*) sur glace sèche, puis conservés à -80°C.

Pour effectuer des analyses microscopiques sur coupes de tissus, les animaux étaient anesthésiés à l'isofluorane et perfusés par voie intra-aortique au paraformaldéhyde 4% solubilisé dans du PBS. Les tissus récoltés étaient ensuite immergés dans du sucrose 30%

dans le PBS à 4°C pendant au moins une nuit, avant d'être coupés au cryostat ou au microtome.

## **2.5 Analyses statistiques**

Les analyses statistiques effectuées dans ce projet ont toutes été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA). Les résultats sont généralement présentés sous forme d'une moyenne des répliques avec l'écart-type (SEM).

Trois types de tests statistiques ont principalement été utilisés : le test de Mann-Whitney, le test de Kruskal-Wallis et l'ANOVA à double voie. La significativité statistique est toujours représentée sous la forme suivante :  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ , où la valeur de  $p$  représente le pourcentage de probabilité que l'effet observé soit attribuable au hasard.

### **2.5.1 Test de Mann-Whitney**

Le test de Mann-Whitney était utilisé dans des conditions de comparaison entre deux groupes de données non appariées présentant des distributions non paramétriques. Les calculs étaient effectués de façon bilatérale, avec un intervalle de confiance de 95%. Une valeur était donc considérée significative avec une valeur de  $p$  inférieure à 0,05.

### **2.5.2 Test de Kruskal-Wallis**

Le test de Kruskal-Wallis est l'équivalent non paramétrique de l'ANOVA à simple voie. Il était effectué pour comparer plusieurs groupes non appariés, soit entre eux ou à une condition contrôle pré-sélectionnée. Une correction de Dunn pour les comparaisons multiples était également appliquée au test, en plus d'un intervalle de confiance de 95%.

### **2.5.3 Test d'ANOVA à double voie**

Ce test est utilisé lorsqu'il y a comparaison de plusieurs groupes selon un paramètre changeant, comme des valeurs à plusieurs temps. Dans ce cas, le test était appliqué pour comparer les différents groupes d'animaux aux multiples temps du test de retrait de la queue. Le test était programmé pour des valeurs non répétées, avec une correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples. L'intervalle de confiance était ajusté à 95%.

## RÉSULTATS

### 3.1 Mise au point d'un modèle *in vitro* d'étude de l'interaction NTS2-SgIII

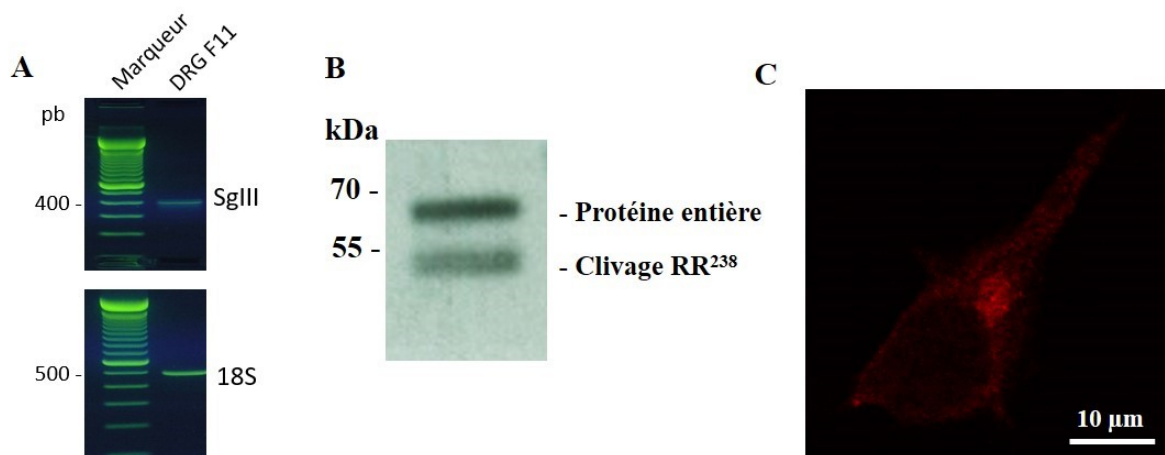
Afin de compléter le volet *in vitro* du projet, la première étape consistait à développer un modèle cellulaire pertinent pour l'étude de l'interaction NTS2-SgIII. Afin de représenter le plus fidèlement possible le contexte physiologique d'intérêt dans ce projet, une lignée neuronale murine a été choisie, soit la lignée DRG F11. Cette lignée a donc l'avantage d'être excitable et de posséder une voie de sécrétion régulée, en plus de provenir en partie d'une cellule neuronale sensorielle de rat.

#### 3.1.1 Expression endogène de la protéine SgIII dans les cellules DRG F11

Dans le but de limiter le besoin de transfecter les deux protéines étudiées, il a d'abord été question de vérifier l'expression endogène de la protéine SgIII dans les cellules DRG F11.

Par la méthode de PCR, l'ADNc de SgIII a été amplifié pendant 35 cycles à l'aide d'amorces spécifiques. L'expression de l'ARNm de SgIII se traduit par la présence d'un produit d'ADN de 388 paires de bases (pb). L'amplification de l'ADNc ribosomique 18S servait de contrôle interne, et donnait un produit de 488 pb (Figure 26a).

L'expression protéique endogène de SgIII a été évaluée par la méthode d'immunobuvardage et d'immunofluorescence, à l'aide de l'anticorps anti-SgIII (lapin) (Figure 26b-c). En immunobuvardage, la protéine endogène produit une bande à 61 et parfois une 2<sup>e</sup> bande à 48 kDa. La première bande représente la protéine entière, alors que la seconde bande correspond au produit d'un premier clivage de la protéine entre les arginines 237 et 238 (Holthuis et al., 1996). En immunofluorescence, la protéine semble se concentrer dans un compartiment intracellulaire qui pourrait représenter le Golgi/TGN, ce qui s'accorde avec son rôle primordial dans la formation des vésicules à corps dense (Hosaka & Watanabe, 2010).



**Figure 26 : Expression endogène de SgIII dans les cellules DRG F11.** (A) L'amplification de l'ARNm de SgIII produit un fragment de 388 pb, alors que l'amplification de l'ARNm du 18S donne un fragment de 488 pb. La bande forte du marqueur de 100 pb correspond à 600 pb. (B) Le marquage spécifique de la protéine SgIII produit deux bandes de 61 et 48 kDa sur immunobuvardage. (C) Le marquage de la protéine SgIII par immunofluorescence démontre une distribution typique de la protéine lorsqu'observée en microscopie confocale. Résultats représentatifs de deux essais distincts.

### 3.1.2 Expression transitoire des protéines rNTS2-YFP et 2HA-rNTS2 dans les DRG F11

Il n'existe actuellement aucune lignée cellulaire immortalisée qui exprime le récepteur NTS2 de façon endogène. Une tentative de créer une lignée stable a d'ailleurs été entreprise, mais le récepteur était rapidement rejeté des cellules, même sous pression sélective. Il a donc été résolu que le récepteur NTS2 serait transfecté de façon transitoire à chaque essai, sous la forme des constructions rNTS2-YFP et 2HA-rNTS2. L'agent de transfection X-tremeGENE HP a permis d'atteindre un pourcentage d'efficacité de transfection avoisinant les 80%, évalué de façon approximative en suivant l'expression de la protéine rNTS2-YFP à l'aide d'un microscope à épifluorescence (résultats non montrés).

#### 3.1.2.1 Expression de l'ARNm et des protéines

Les niveaux d'expression de l'ARNm ont donc été vérifiés par qPCR, alors que l'expression protéique était validée par immunobuvardage et immunofluorescence.

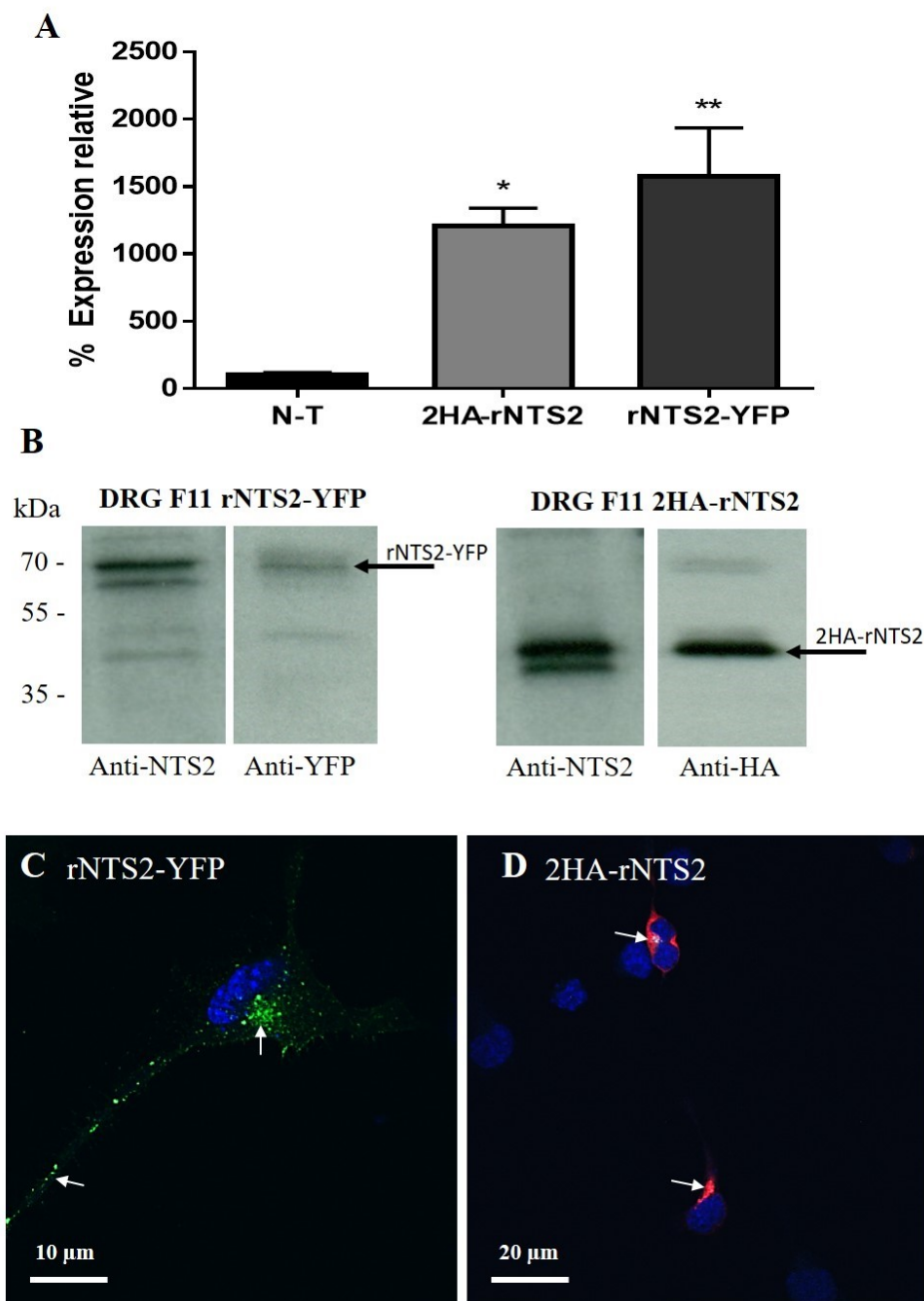
Les valeurs obtenues en qPCR ont été normalisées à l'aide des gènes de référence HPRT et ODC, et comparées aux niveaux d'expression des cellules DRG F11 non transfectées (N-T), ajustés à 100% d'expression. Les cellules DRG F11 2HA-rNTS2 et rNTS2-YFP



présentaient une expression de NTS2 respectivement 12 et 15 fois supérieure aux cellules N-T (Figure 27a).

En immunobuvardage, les protéines rNTS2-YFP et 2HA-rNTS2 produisent respectivement des bandes de 67 kDa et 42 kDa lorsque reconnues par l'anticorps anti-NTS2 (Figure 27b). Les anticorps anti-YFP (rNTS2-YFP) et anti-HA (2HA-rNTS2) révèlent des bandes de même poids moléculaire que l'anticorps anti-NTS2. Il est également possible de noter l'apparition de plusieurs bandes sur les immunobuvardages effectués avec l'anticorps anti-NTS2. Celles-ci pourraient représenter des formes incomplètes des constructions effectuées, où le récepteur NTS2 serait exprimé sans les étiquettes. Cependant, la faible spécificité de l'anticorps anti-NTS2 est aussi à considérer, puisqu'il s'agit d'un antisérum de lapin. Afin de limiter le marquage non spécifique, seuls les anticorps dirigés contre les étiquettes des différentes constructions du récepteur NTS2 ont été utilisés pour la suite du projet.

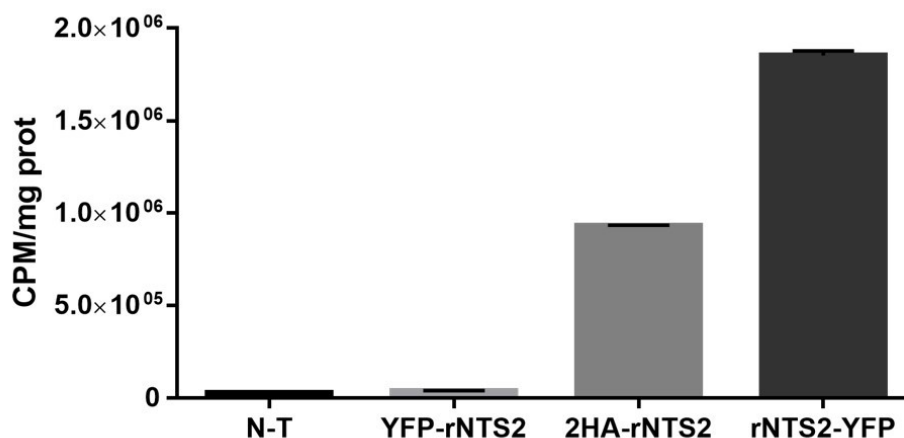
Au microscope confocal, il est possible de suivre directement l'expression de la protéine rNTS2-YFP, alors que la protéine 2HA-rNTS2 est observable suivant une immunofluorescence à l'aide de l'anti-HA (Figures 27c-d). Le marquage fluorescent des constructions du récepteur NTS2 correspond à la distribution intracellulaire caractéristique du RCPG, précédemment décrite dans des systèmes d'expression hétérologue ou encore exprimant de façon endogène le récepteur NTS2 (Perron *et al.*, 2006; Sarret *et al.*, 2002).



**Figure 27 : Expression transitoire des protéines rNTS2-YFP et 2HA-rNTS2 dans les DRG F11.** (A) La transfection des plasmides 2HA-rNTS2 et rNTS2-YFP dans les cellules DRG F11 induit une transcription efficace de l'ARNm des constructions en comparaison avec des cellules non transfectées (N-T). Kruskal-Wallis comparé à la condition N-T,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ , 6 échantillons par condition. (B) Les protéines rNTS2-YFP et 2HA-rNTS2 produisent respectivement des bandes de 67 et 42 kDa sur immunobuvardage, lorsque révélées par l'anticorps anti-NTS2 ou les anticorps anti-YFP et anti-HA. (C-D) En microscopie confocale, le marquage fluorescent des constructions du récepteur NTS2 correspond à la distribution intracellulaire caractéristique du RCPG. Coloration du noyau au DAPI (bleu). Résultats représentatifs de deux essais distincts.

### 3.1.2.2 Liaison de la neurotensine

Après avoir vérifié l'expression efficace des différentes constructions, il fallait s'assurer que celles-ci étaient aptes à lier la neurotensine. Pour le vérifier, des essais de radioliation sur des préparations de membranes de DRG F11 transfectées ont été effectués à l'aide de neurotensine iodée. Ces expérimentations ont été réalisées sous une seule dose de ligand radioactif ( $300\,000 - 3,0 \times 10^5$  CPM), en soustrayant les comptes non spécifiques obtenus en présence du ligand froid des comptes totaux. La figure 28 illustre les CPM/mg prot. retenus de façon spécifique par les préparations membranaires.



**Figure 28 : Liaison de la NT- $I^{125}$  sur les constructions du récepteur NTS2.** La capacité de liaison du ligand sur les constructions de NTS2 est exprimée en termes de CPM de NT- $I^{125}$  spécifiquement retenue sur les préparations membranaires par mg de protéines présentes dans les échantillons. Échantillons en duplicata provenant d'un seul essai.

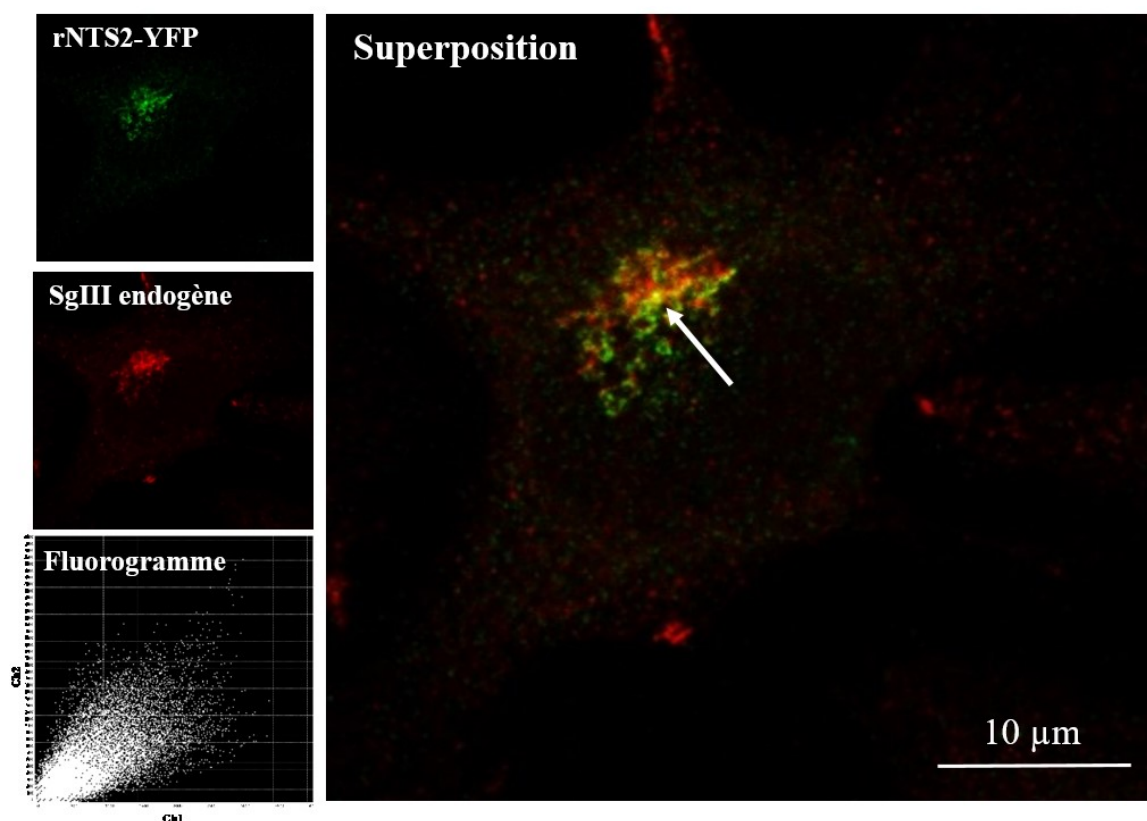
Les résultats de la figure 28 démontrent une excellente capacité de liaison de la neurotensine sur les constructions 2HA-rNTS2 et rNTS2-YFP, soit de  $9 \times 10^5$  et  $18 \times 10^5$  CPM/mg prot. respectivement. Puisqu'elle est deux fois supérieure à la construction rNTS2-YFP, pour la même quantité d'ADN transfectée dans les cellules ( $10\,\mu\text{g}$ ), c'est celle-ci qui a été choisie afin d'effectuer la suite des expérimentations de radioliation. Concernant la construction YFP-rNTS2, sa reconnaissance de la neurotensine ( $0,4 \times 10^5$  CPM/mg prot.) se situe aux mêmes niveaux que les cellules contrôles non transfectées ( $0,3 \times 10^5$  CPM/mg prot.). Ce phénomène témoigne de l'effet de la position des étiquettes sur les constructions de récepteurs, qui peuvent engendrer de l'encombrement stérique et limiter la liaison du ligand, ou même modifier l'activité fonctionnelle de ceux-ci (Fonda *et al.*, 2002).

### 3.1.3 Interaction NTS2-SgIII dans les cellules DRG F11

Pour procéder à la suite de la validation du modèle *in vitro*, il était important de confirmer que l'interaction NTS2-SgIII avait effectivement lieu dans celui-ci. L'interaction avait déjà été démontrée auparavant par criblage double hydride et par immunoprécipitation dans un autre modèle cellulaire. Pour compléter ces données, des essais de colocalisation subcellulaire et de GST pull down, ainsi que des expériences de FRET ont été effectués, en plus d'une exploration du modèle d'interaction faisant intervenir les corps multi-vésiculaires.

#### 3.1.3.1 Colocalisation subcellulaire

Une première approche utilisée pour déterminer l'interaction entre les deux protéines est la colocalisation subcellulaire par microscopie confocale. L'expression de la protéine rNTS2-YFP a été suivie grâce à l'émission du fluorophore YFP, alors qu'une immunofluorescence anti-SgIII (lapin) a permis de marquer la protéine SgIII endogène.



**Figure 29 : Colocalisation subcellulaire des protéines rNTS2-YFP et SgIII dans les cellules DRG F11.** Le marquage de la protéine rNTS2-YFP est fortement superposé au signal émis par la protéine SgIII endogène. Images obtenues au microscope à super-résolution Leica STED avec l'objectif 60X et les lasers de déplétion de 592 nm (YFP) et 660 nm (Alexa Fluor 594 – IF anti-SgIII). Image représentative d'acquisitions effectuées en triplicata.

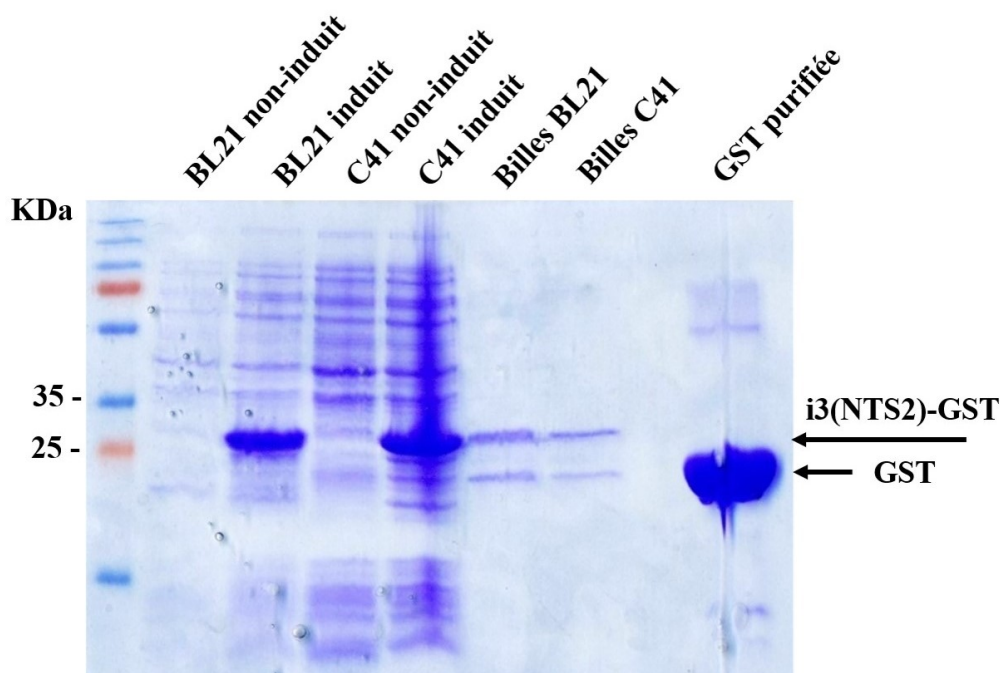
Une quantification de la colocalisation à l'aide du logiciel Fiji a permis d'obtenir le fluorogramme qui représente la distribution du signal dans les deux canaux (Figure 29). Ce graphique permet au logiciel de calculer un coefficient de Pearson, soit le coefficient de corrélation linéaire qui lie la distribution de l'intensité du marquage entre les deux fluorophores. Cette valeur était de  $0,62 \pm 0,05$ , ce qui représente une bonne corrélation. Un résultat qui nous intéresse davantage en microscopie est le coefficient de Manders, qui témoigne de la superposition réelle entre les pixels des deux fluorophores (Zinchuk & Grossenbacher-Zinchuk, 2009). Celui-ci était de  $0,76 \pm 0,06$  dans l'ensemble de la cellule, et augmentait à  $0,82 \pm 0,06$  lorsqu'une région d'intérêt était tracée autour du compartiment subcellulaire qui présente la plus haute concentration du marquage. Ces valeurs signifient qu'entre 76% et 82% des pixels d'un canal sont effectivement superposés aux pixels du second canal. Ces résultats suggèrent une excellente colocalisation des deux protéines, donc une possible interaction entre celles-ci.

### 3.1.3.2 *GST pull down*

Pour soutenir les résultats obtenus avec la colocalisation cellulaire, un essai de GST pull down a été effectué avec des billes glutathion-sépharose 4B (GS4B) couplées à la protéine de fusion i3(NTS2)-GST. L'objectif de cet essai était donc de vérifier s'il était possible de repêcher la protéine SgIII exprimées de façon endogène dans un lysat de protéines totales de cellules DRG F11 sur les billes i3(NTS2)-GST.

La première étape de l'expérimentation consistait à confirmer la production adéquate de la protéine de fusion par les bactéries productrices BL21 et C41, sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (Figure 30). Le poids théorique attendu de la protéine i3(NTS2)-GST est de  $\pm 33$  kDa, alors que celui de la GST est d'environ 25 kDa. Il est possible d'observer que l'induction à l'IPTG fait apparaître une forte bande entre 25 et 35 kDa dans les puits « BL21 induit » et « C41 induit » par-rapport aux puits correspondants aux contrôles non induits. Cette efficacité de production de la protéine se reflète dans l'apparition d'une bande à la même hauteur dans les puits où ont été déposées les billes GS4B incubées avec les protéines de fusion. Il semble cependant y avoir eu production d'une protéine incomplète, retenue sur les billes, étant donné la présence d'une 2<sup>e</sup> bande de  $\pm 25$  kDa. En raison du poids moléculaire et l'affinité pour le glutathion de cette protéine, il pourrait s'agir de la portion

GST seulement, causé par une traduction incomplète de la construction i3(NTS2)-GST ou un clivage par les protéases bactériennes entre les portions i3(NTS2) et GST.

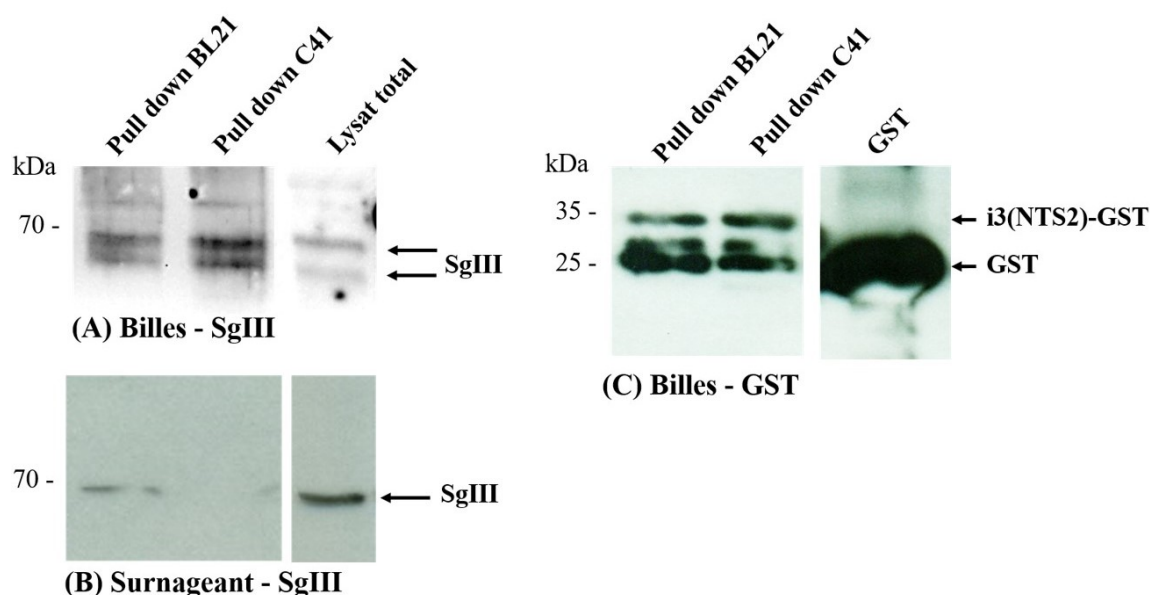


**Figure 30 : Couplage de la protéine i3(NTS2)-GST avec les billes glutathion-sépharose.** L'induction à l'IPTG induit la production de la protéine i3(NTS2)-GST dans les bactéries BL21 et C41, observable par l'apparition d'une bande à la hauteur de 33 kDa dans les puits « BL21 induit » et « C41 induit ». Cette protéine est ensuite purifiée à l'aide des billes GS4B, démontré dans les puits « Billes BL21 » et « Billes C41 ». Résultat représentatif d'une expérience effectuée en duplicata.

Étant donné une bonne production et une purification acceptable de la protéine de fusion sur les billes GS4B, il était possible de poursuivre avec la suite de l'expérimentation. Les billes couplées avec i3(NTS2)-GST de BL21 et C41 ont donc été incubées avec le lysat cellulaire des cellules DRG F11. Trois SDS-PAGE et immunobuvardages ont ensuite été réalisés en parallèle : une révélation de SgIII sur les billes du pull down (Figure 31a), une révélation de SgIII dans le surnageant du pull down (Figure 31b) et la révélation de la construction i3(NTS2)-GST sur les billes du pull down (Figure 31c). Sur les gels destinés à l'immunobuvardage contre SgIII, un lysat total de cellules DRG F11 a été déposé, alors que la protéine GST purifiée a été ajoutée au gel prévu pour l'immunobuvardage anti-GST à titre de contrôle.

Les résultats démontrent la révélation des deux bandes caractéristiques de la protéine SgIII endogène sur l'immunobuvardage des billes du pull down. Ce résultat signifie que la

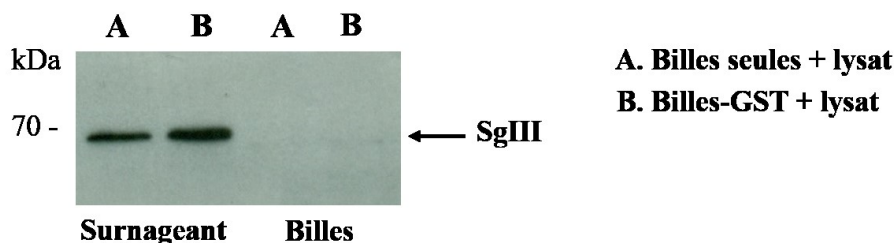
protéine a effectivement été retenue par i3(NTS2)-GST sur les billes. Par contre, on la détecte également faiblement dans le surnageant du pull down, ce qui pourrait s'expliquer par une présence en excès de SgIII dans le lysat cellulaire par-rapport à la quantité de i3(NTS2)-GST sur les billes. De plus, il est possible de détecter la présence de la protéine de fusion i3(NTS2)-GST sur les billes, qui présente les mêmes deux bandes de  $\pm 35$  kDa et  $\pm 25$  kDa observées précédemment sur le gel coloré au bleu de Coomassie.



**Figure 31 : Essai de GST pull down avec les protéines SgIII et i3(NTS2)-GST.** (A) Un immunobuvardage anti-SgIII (chèvre) révèle les deux bandes caractéristiques de la protéine SgIII sur les billes du pull down, autant pour la protéine de fusion produite chez les bactéries BL21 que C41. (B) La protéine SgIII est faiblement détectée dans le surnageant du pull down par l'anticorps anti-SgIII (chèvre). (C) La protéine de fusion i3(NTS2)-GST est révélée par l'anti-GST-HRP sur les billes du pull down.

Pour assurer que l'interaction observée était bien attribuable à la présence de la portion i3(NTS2), deux contrôles du pull down ont été effectués. Le premier contrôle consistait en des billes seules en présence du lysat cellulaire, afin de vérifier que la protéine SgIII n'interagissait pas avec la glutathione, ou n'était pas précipitée avec les billes au moment des centrifugations. Le second contrôle était constitué des billes GS4B couplées à la protéine GST seulement, incubées avec le lysat cellulaire, dans le but de confirmer que la portion i3(NTS2) était bien nécessaire à l'interaction. Dans les deux cas, la protéine SgIII est fortement révélée dans le surnageant du pull down, et absente des billes, ce qui renforce la confiance accordée aux résultats obtenus de cette expérimentation (Figure 32).





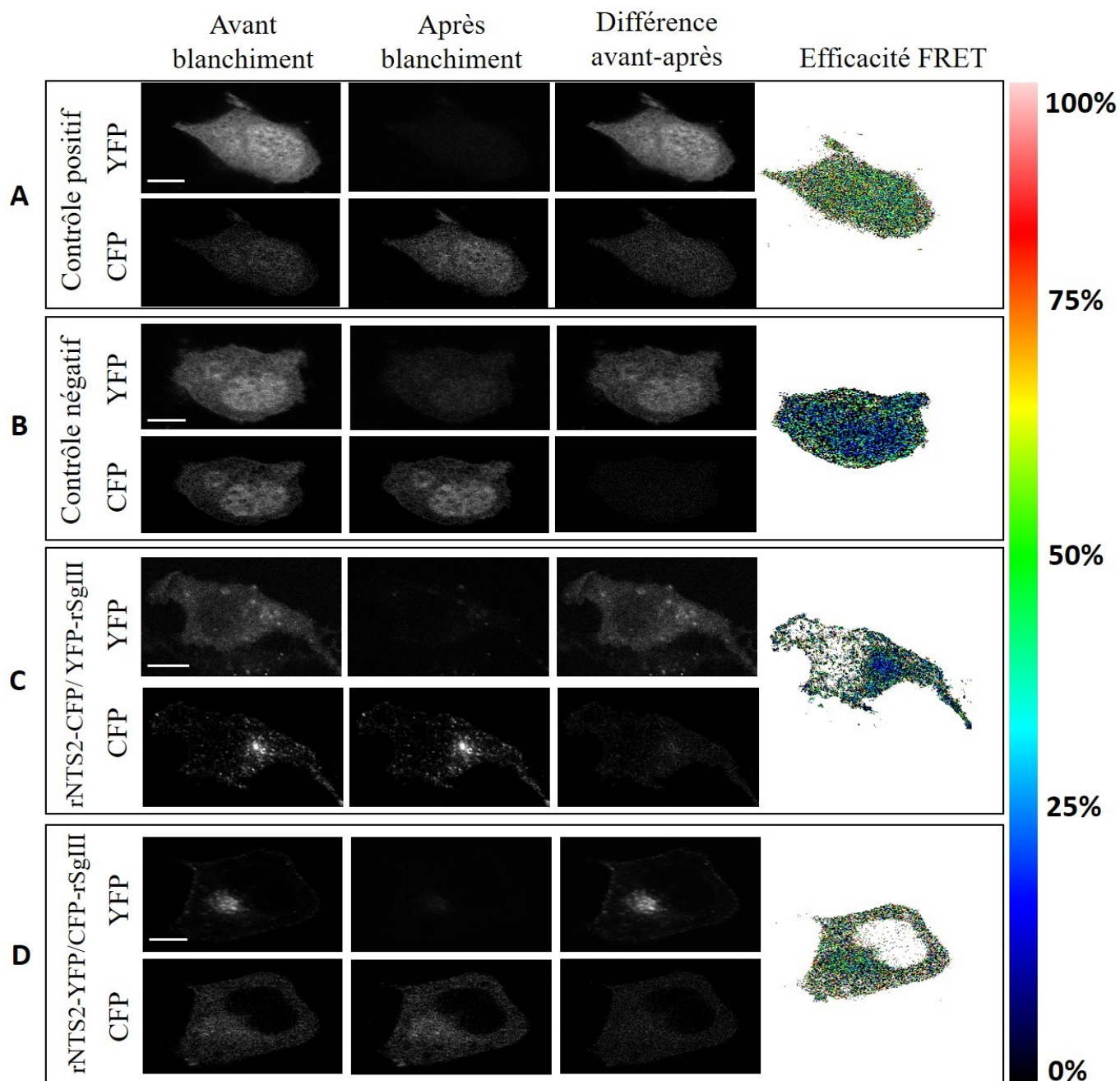
**Figure 32 : Absence de liaison non-spécifique entre la protéine SgIII et les billes seules ou couplées à la GST.** Des contrôles des billes GS4B seules (A) et couplées à la GST (B) démontrent que la protéine SgIII n'est pas retenue sur les billes, et plutôt révélée dans le surnageant du pull down.

### 3.1.3.3 FRET : Transfert d'énergie par molécules fluorescentes

L'interaction entre les deux protéines a finalement été vérifiée à l'aide d'un essai de FRET. Dans cette expérimentation, il s'agissait de mesurer l'efficacité de transfert d'énergie entre les couples rNTS2-YFP/CFP-rSgIII ainsi que rNTS2-CFP/YFP-rSgIII, où CFP est le donneur et YFP l'accepteur. Le plasmide contenant la construction CFP-Gly-YFP a été utilisé comme contrôle positif (Figure 33a), alors que la co-transfection des plasmides PeYFP-C1 et PeCFP-C1 servait de contrôle négatif (Figure 33b). Les différentes constructions de NTS2 et SgIII ne produisaient évidemment aucun signal FRET lorsque transfectées de façon individuelle (résultats non montrés) et ont servi à régler les paramètres d'acquisition du microscope confocal Olympus pour la mesure de FRET sur les couples d'interaction (Figures 33c-d).

Premièrement, le contrôle positif démontre une efficacité FRET avoisinant les 50% à 100% selon les pixels, ce qui témoigne de l'échange d'énergie effectué entre les fluorophores YFP et CFP, positionnés sur la même protéine de fusion dans ce cas. Ensuite, le contrôle négatif, où aucune interaction entre les fluorophores n'est attendue, affiche une efficacité FRET avoisinant les 0% pour la majorité des pixels. D'ailleurs, aucune différence dans l'émission de CFP n'est observable après blanchiment de l'accepteur (YFP). Concernant les couples d'intérêt, une faible efficacité FRET, située davantage entre 0% et 50% selon les régions cellulaires, témoigne d'une pauvre interaction entre les protéines. Il existe cependant plusieurs hypothèses pour expliquer ce résultat, qui seront exposées dans la section discussion.





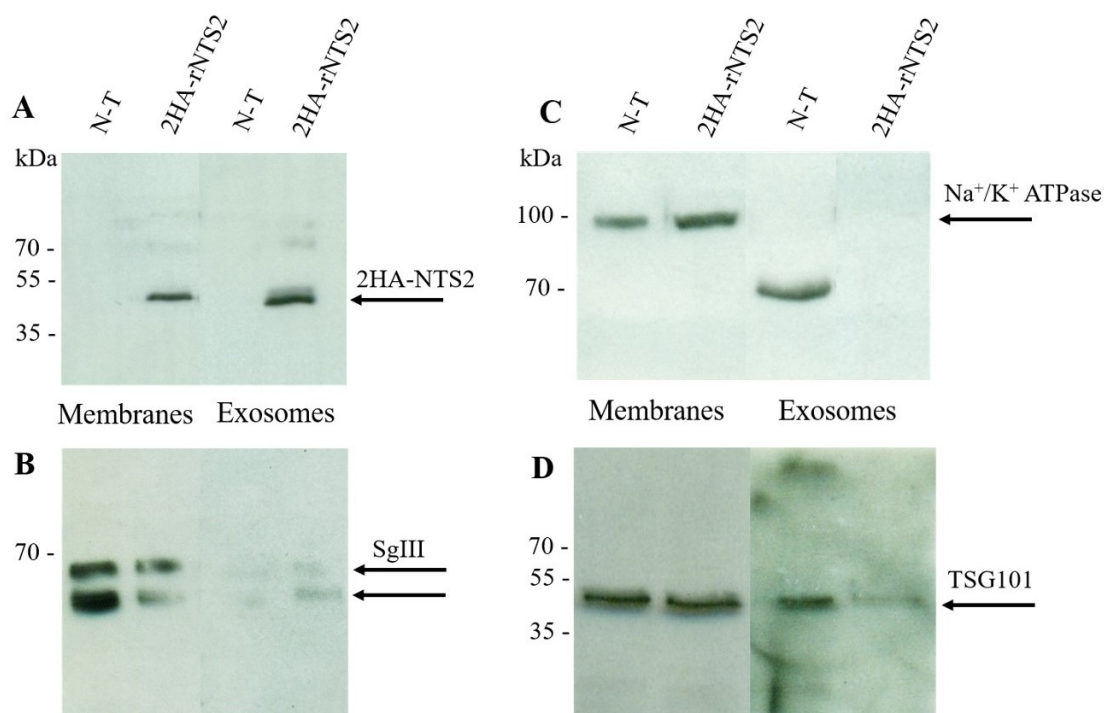
**Figure 33 : Mesure de l'interaction des couples rNTS2-YFP/CFP et rSgIII-CFP/YFP par essai FRET.** Dans tous les cas, l'accepteur (YFP) affiche une émission nettement réduite dans l'image « après blanchiment » qui témoigne d'un photoblanchiment efficace. L'image « différence avant-après » montre la différence d'émission entre les conditions pré- et post-photoblanchiment. Concernant le donneur, une différence d'émission signifie qu'il y avait échange d'énergie, et sera traduite sous forme d'efficacité FRET, calculée entre 0 et 100% pour chaque pixel dans l'image « efficacité FRET ». Les pixels sont colorés individuellement selon le résultat du calcul et l'échelle de couleur affichée à la droite de la figure. Une efficacité FRET qui tend vers 100% signifie une excellente interaction. Échelle = 10  $\mu$ m. Images représentatives d'acquisitions effectuées en triplicata, de deux expériences distinctes.

### 3.1.3.4 Vérification du modèle d'interaction impliquant les corps multi-vésiculaires

Tel que mentionné dans l'introduction, le positionnement des protéines SgIII et NTS2 dans l'environnement vésiculaire soulève des interrogations quant à la probabilité d'interaction via la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur.

L'hypothèse proposée pour expliquer ce phénomène fait intervenir un intermédiaire de sécrétion : le corps multi-vésiculaire (MVB). Dans l'optique de vérifier ce modèle, l'idée était de valider la présence du récepteur NTS2 dans une sous-composante des MVB, qu'on appelle les exosomes. En effet, le contenu des MVB peut être destiné à la dégradation par les lysosomes ou à la sécrétion sous forme de petites vésicules extracellulaires. La logique voulait donc qu'un récepteur empruntant les MVB comme intermédiaire de sécrétion se retrouve en partie excrété par les exosomes.

Les exosomes ont donc été purifiés du surnageant de cellules DRG F11 transfectées avec le plasmide 2HA-rNTS2. Le culot obtenu suite aux ultracentrifugations a été déposé sur gel SDS-PAGE, puis analysé par immunobuvardage avec les anticorps anti-HA, anti-SgIII (lapin), anti-TSG101 et anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (Figure 34). Comme contrôle, des préparations membranaires de ces cellules ont également été déposées sur le gel.



**Figure 34 : Révélation des protéines NTS2 et SgIII dans les préparations d'exosomes.**  
(A) Le récepteur NTS2 est identifié dans les exosomes purifiés des cellules DRG F11

exprimant 2HA-rNTS2, à l'aide de l'anticorps contre HA. (B) La protéine SgIII est présente dans les exosomes des cellules N-T et exprimant 2HA-rNTS2, révélée par l'anti-SgIII (lapin). (C) La protéine Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase entière n'est pas présente dans la préparation exosomale. (D) Le marqueur exosomal TSG101 semble exprimé par les préparations d'exosomes. Résultats représentatifs d'une expérience effectuée en duplicata pour 2HA-rNTS2 et SgIII.

La figure 34 démontre que le récepteur NTS2 ainsi que la protéine SgIII se retrouvent effectivement dans les exosomes sécrétés par les cellules DRG F11. De plus, la présence du marqueur exosomal TSG101 sur immunobuvardage vient renforcer l'essai en servant de preuve qu'il s'agit bien d'exosomes. Effectivement, cette protéine cytoplasmique de 46 kDa est connue comme faisant partie de la machinerie moléculaire permettant aux vésicules de bourgeonner dans les MVB et est présente de façon enrichie dans les exosomes neuronaux (Fauré *et al.*, 2006). Il est également probable de la retrouver dans les préparations membranaires, comme c'est le cas ici. En effet, nous employons une méthode de purification membranaire rapide et peu stringente, qui isole la totalité des membranes cellulaires, y compris les membranes des organelles. Comme TSG101 fait partie d'un complexe qui s'associe de façon transitoire avec la membrane des MVB, il n'est pas surprenant de le détecter dans une préparation de membranes totales (Katzmann *et al.*, 2002). Aussi, l'absence de la protéine Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase permet de s'assurer que les résultats observés ne proviennent pas de débris membranaires récoltés dans la purification, puisque cette protéine n'est pas exprimée par les exosomes neuronaux (Fauré *et al.*, 2006). Il est tout de même curieux de noter l'apparition d'une bande à la hauteur de 70 kDa dans l'immunobuvardage anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pour l'échantillon d'exosomes provenant de cellules non transfectées (N-T). Puisque la protéine entière a un poids moléculaire de 100 kDa, il s'agit probablement d'un sous-produit de dégradation, ou d'une forme incomplète et non fonctionnelle de la pompe. D'ailleurs, le premier rôle attribué aux exosomes était de servir de voie d'expulsion pour des composantes cellulaires indésirables, alternative aux voies de dégradation classiques (Thébaud & Stewart, 2012). Il est cependant difficile d'expliquer pourquoi cette bande n'apparaît pas dans la préparation exosomale provenant de cellules transfectées avec la protéine 2HA-rNTS2.

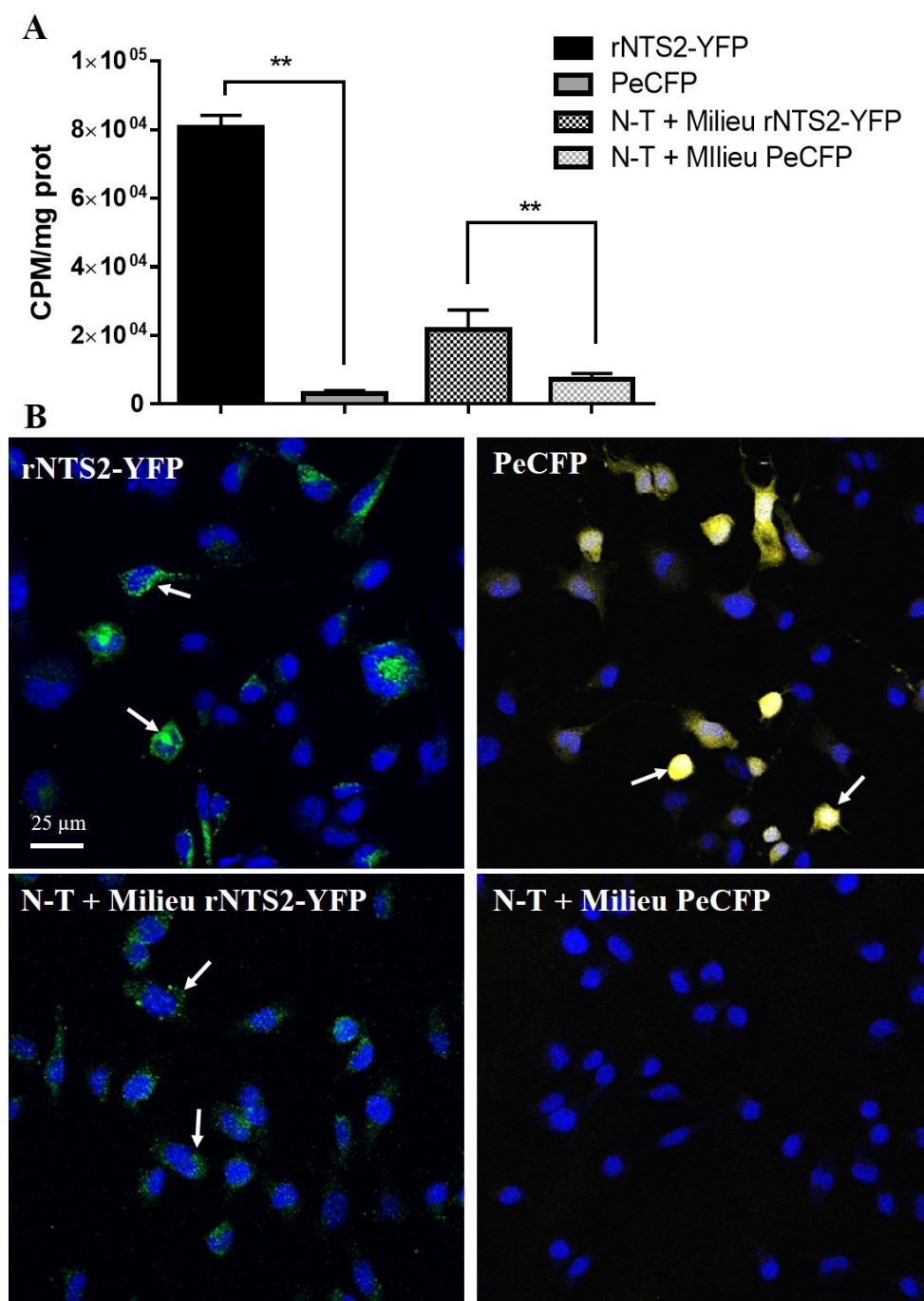
Nous savons maintenant que les exosomes représentent bien plus qu'une voie cellulaire « poubelle », mais peuvent notamment participer à la communication intercellulaire (Budnik *et al.*, 2016). Pour vérifier la capacité des cellules DRG F11 à partager leur contenu exosomal

à une autre cellule, un essai de transfert du récepteur NTS2 a été réalisé. Le surnageant de cellules transfectées avec le récepteur rNTS2-YFP a été récolté, centrifugé 20 minutes à  $2\,000 \times g$  pour enlever les débris cellulaires, et déposé sur de nouvelles cellules DRG F11 non transfectées (N-T). Un essai de radioliation sur cellules entières avec une seule dose ( $300\,000 - 3 \times 10^5$  CPM) de neurotensine iodée, en présence ou non du ligand froid, a ensuite été fait afin d'évaluer la présence du récepteur NTS2, en plus d'observations en microscopie confocale (Figure 35). Les mêmes expérimentations ont été réalisées avec des cellules transfectées avec le vecteur PeCFP-C1 afin de servir de contrôle négatif dans l'expérimentation. Les comptes spécifiquement retenus par les cellules en termes de CPM/mg prot. sont exposés à la figure 35a.

Les résultats obtenus à la figure 35 montrent que le récepteur NTS2 peut effectivement être transféré d'une cellule qui l'exprime vers une cellule qui ne l'exprime pas, par l'entremise d'un transporteur présent dans le milieu extracellulaire. Premièrement, à la figure 35a, l'expression adéquate du récepteur NTS2 est vérifiée dans les cellules transfectées avec le plasmide rNTS2-YFP, puisque celles-ci parviennent à retenir  $8,0 \times 10^4$  CPM/mg prot. de NT-I<sup>125</sup>. Tel qu'attendu, ce résultat est significativement supérieur aux quantités de ligand radioactif lié sur les cellules PeCFP ( $0,3 \times 10^4$  CPM/mg prot.), considérées comme contrôle négatif. Il est intéressant de voir la capacité des cellules non transfectées, mises en contact seulement avec le milieu des cellules rNTS2-YFP, à retenir  $2,2 \times 10^4$  CPM/mg prot. de NT-I<sup>125</sup>. Ce résultat est également significativement différent du contrôle négatif, N-T + Milieu PeCFP, qui ne lie que  $0,7 \times 10^4$  CPM/mg prot. de ligand radioactif. Les résultats de l'essai de radioliation sont corroborés par les observations effectuées en microscopie confocale, à la figure 35b. Effectivement, l'émission de YFP par la protéine rNTS2-YFP s'observe autant chez les cellules transfectées avec le plasmide rNTS2-YFP, que chez les cellules non transfectées qui ont été traitées avec le milieu des rNTS2-YFP. Chez notre contrôle négatif, la présence de CFP s'examine uniquement chez les cellules transfectées avec le plasmide PeCFP-C1, indiquant que cette protéine n'est pas transférable d'une cellule à l'autre, donc probablement absente des exosomes.

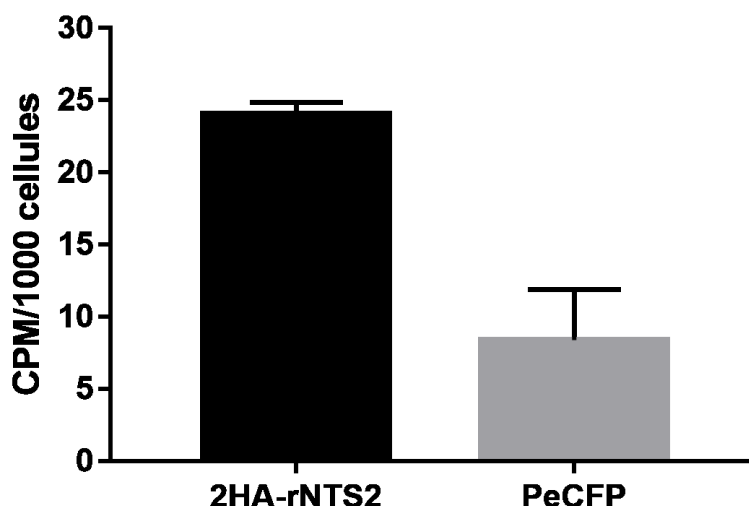
Dans le but de déterminer si les vésicules extracellulaires pouvaient être réellement responsables du transfert d'un récepteur NTS2 fonctionnel d'une cellule à l'autre, nous avons voulu valider directement la capacité de radioliation d'une préparation d'exosomes. Pour ce

faire, des exosomes obtenus à partir du surnageant de cellules DRG F11 transfectées avec le récepteur NTS2 ont été incubés avec 300 000 CPM de neurotensine iodée, sur des filtres avec pores de 0,05  $\mu\text{m}$  (Figure 36). En parallèle, les exosomes provenant de cellules transfectées avec le vecteur PeCFP ont également été testés afin de servir de contrôle négatif.



**Figure 35 : Transférabilité du récepteur NTS2 par le milieu extracellulaire.** (A) Les cellules transfectées avec le plasmide rNTS2-YFP lient efficacement la neurotensine, de façon significativement supérieure aux cellules qui n'expriment pas le récepteur (PeCFP).

Des cellules non-transfectées (N-T) mises en contact avec le milieu des cellules transfectées rNTS2-YFP parviennent à retenir la NT-I<sup>125</sup> avec succès, en comparaison avec des cellules N-T incubées dans le milieu de cellules transfectées avec le vecteur PeCFP. Test de Mann-Whitney,  $**p < 0,01$ , échantillons en duplicata. (B) L'émission de YFP (vert) provenant de la construction rNTS2-YFP est observable chez les cellules N-T ayant été traitées avec le milieu des cellules rNTS2-YFP, alors qu'il est impossible de voir le signal du CFP (jaune) chez les cellules traitées avec le milieu des cellules PeCFP. Coloration du noyau au DAPI (bleu). Images représentatives d'acquisitions effectuées en triplicata, de deux essais distincts.



**Figure 36 : Liaison de la NT-I<sup>125</sup> sur les exosomes de cellules exprimant le récepteur NTS2.** Les exosomes exprimés par les cellules transfectées avec la protéine 2HA-rNTS2 semblent retenir davantage de NT-I<sup>125</sup> que les exosomes provenant de cellules transfectées avec le vecteur PeCFP. Les données sont exprimées en CPM de radioactivité retenue sur les filtres par 1000 cellulesensemencées dans les Pétris ayant servis à la récolte des exosomes. Échantillons en duplicata provenant de deux essais distincts.

Les résultats de la figure 36 démontre de façon préliminaire une liaison de la neurotensine iodée supérieure sur les exosomes provenant de cellules transfectées avec la protéine 2HA-rNTS2 que sur les exosomes de cellules transfectées avec le vecteur PeCFP. En effet, la condition 2HA-rNTS2 montre une rétention de 24 CPM de radioactivité par 1000 cellules, ce qui est trois fois plus élevé que la condition PeCFP (8 CPM/1000 cellules). Cette différence n'est cependant pas statistiquement significative au test de Mann-Whitney, ce qui peut s'expliquer par la petite taille de l'échantillon.

### 3.2 Modulation de l'interaction NTS2-SgIII dans le modèle cellulaire DRG F11

Dans le but de caractériser le rôle de la protéine SgIII vis-à-vis de la fonctionnalité du récepteur NTS2, il a d'abord été déterminé de moduler l'expression de la protéine SgIII. Pour ce faire, l'approche de l'invalidation génique a été utilisée. Ensuite, puisque plusieurs évidences pointent vers un adressage régulé pour NTS2, il apparaissait pertinent de valider l'effet de différents stimuli sur l'adressage membranaire du récepteur.

#### 3.2.1 Invalidation génique de la protéine SgIII à l'aide des DsiRNAs

La séquence de DsiRNA retenue au premier criblage réalisé par IDT (SgIII 1890) a d'abord été validée dans le modèle de cellules DRG F11. Pour déterminer la capacité du DsiRNA SgIII 1890 à induire une diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine SgIII, des essais de qPCR, d'immunobuvardage et d'immunofluorescence ont été effectués (Figure 37).

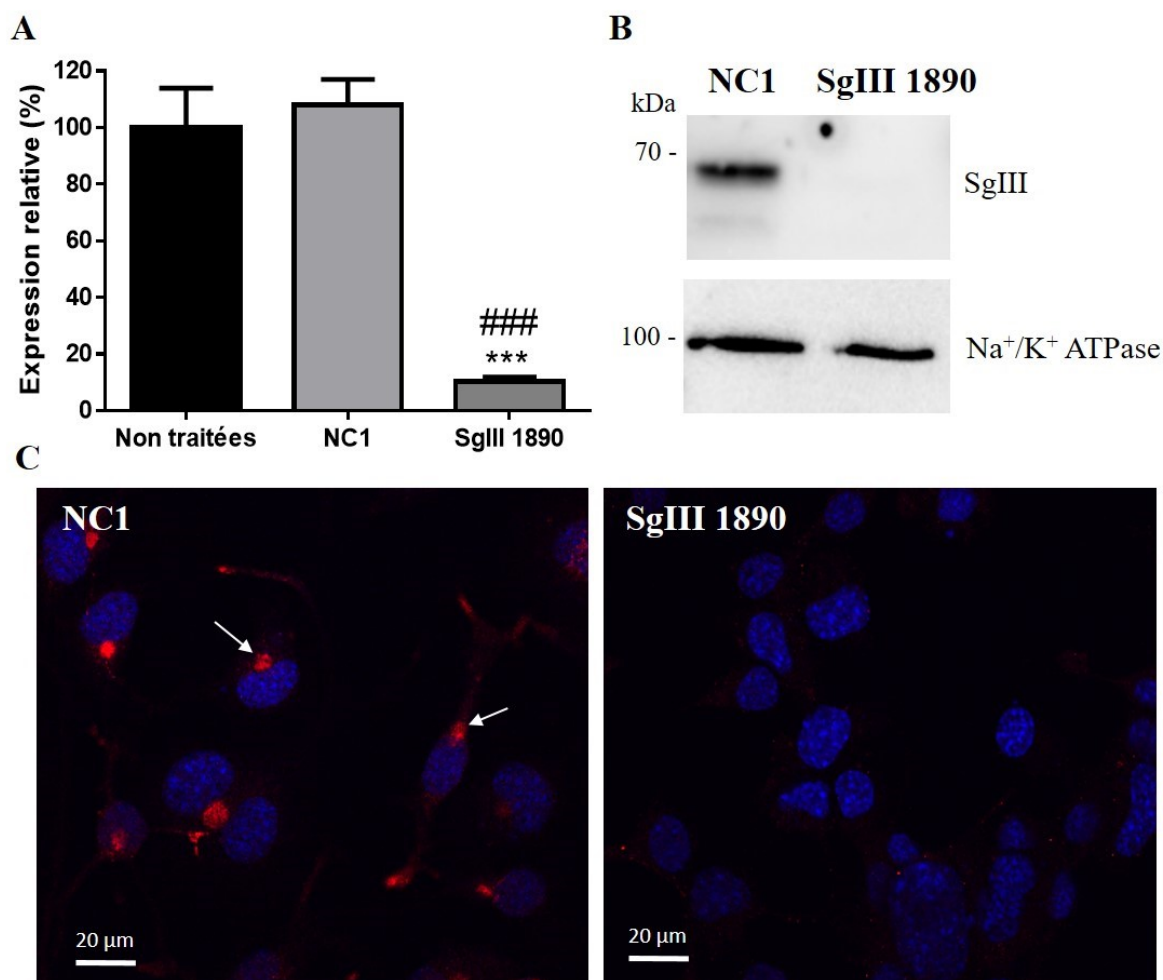
Les résultats obtenus en qPCR (Figure 37a) témoignent d'une invalidation particulièrement efficace de l'ARN messager de la protéine. En ajustant les niveaux d'expression relative des cellules DRG F11 non traitées à 100%, on observe une diminution de 90% de l'expression de l'ARNm de SgIII dans les cellules traitées au DsiRNA SgIII 1890. De plus, le DsiRNA NC1, notre contrôle négatif, n'a effectivement aucun effet sur l'expression de l'ARNm de SgIII, puisqu'il maintient des niveaux près de 100% (107%).

En ce qui concerne l'expression protéique, l'immunobuvardage anti-SgIII (lapin) montre une absence totale de bande pour les cellules traitées au DsiRNA SgIII, comparées aux cellules traitées avec NC1. Aussi, la présence de la protéine  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase dans les deux échantillons démontre qu'il s'agit bien d'un effet du traitement, et que la même quantité de protéines a été déposée sur le gel.

Enfin, les résultats en IF avec l'anticorps anti-SgIII (lapin) corroborent les données précédentes, où une diminution évidente du marquage est observée sur les images prises avec les mêmes paramètres d'acquisition.

L'efficacité des DsiRNAs dirigés contre SgIII étant démontrée dans le modèle cellulaire, il était alors possible de poursuivre avec la prochaine étape, soit de vérifier l'impact de l'invalidation de SgIII sur l'adressage membranaire du récepteur NTS2.



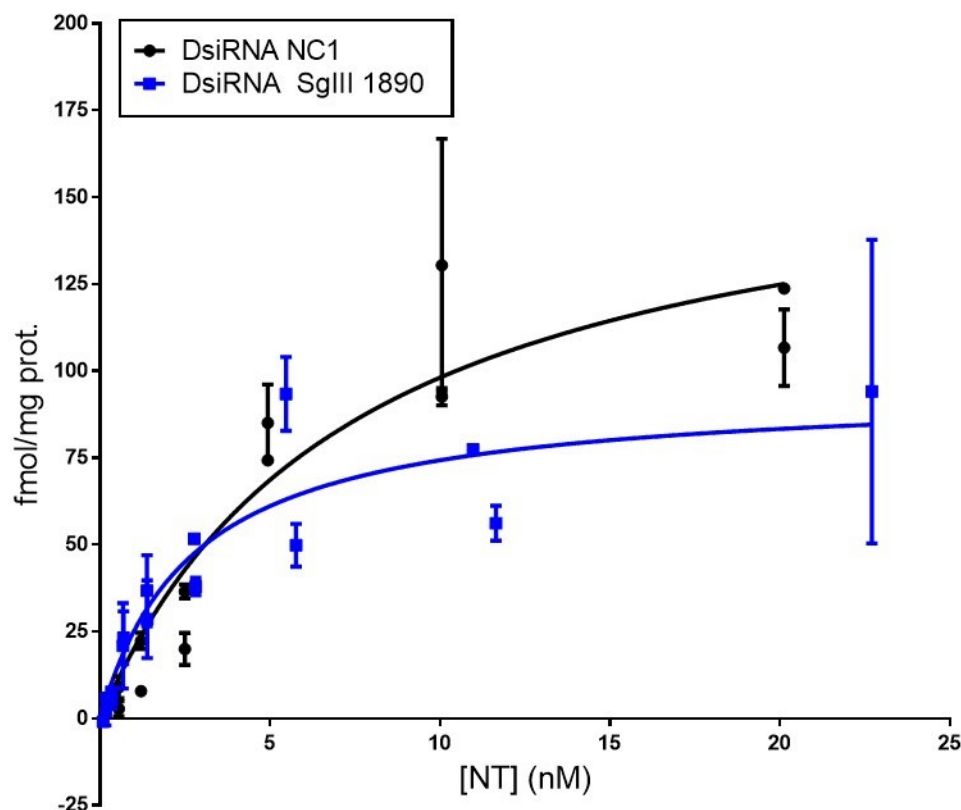


**Figure 37 : Invalidation de SgIII dans les cellules DRG F11 par le DsiRNA SgIII 1890.** (A) Niveaux d'ARNm de SgIII exprimés en pourcentage d'expression relative, normalisés à la condition « non traitées ». Le DsiRNA SgIII 1890 induit une invalidation significative de l'ARNm de SgIII par rapport aux cellules non traitées (\*) et NC1 (#). Test de Kruskal-Wallis, \*\*\* $p < 0,001$ , 9 échantillons par condition. (B-C) La protéine SgIII est invalidée dans les cellules traitées au DsiRNA SgIII 1890, observables en IB et en IF à l'aide de l'anticorps anti-SgIII (lapin). Dans les images d'IF obtenues en microscopie confocale, SgIII est colorée en rouge, alors que le noyau est marqué en bleu (DAPI). Résultats représentatifs d'une expérimentation effectuée en triplicata.

### 3.2.2 Impact d'une invalidation de SgIII sur l'adressage du récepteur NTS2

La capacité du récepteur NTS2 à être adressé à la membrane en absence de la protéine SgIII a été caractérisée à l'aide de radioliation en saturation sur des cellules entières, dans le but d'obtenir un aperçu relatif du nombre de sites récepteurs présents à la membrane (Figure 38).





**Figure 38 : Effet de l'invalidation de SgIII sur la liaison de la NT-I<sup>125</sup>.** La quantité de ligand radioactif retenu spécifiquement par les cellules DRG F11 entières exprimant rNTS2-YFP est exprimée en fmol/mg protéines. Les sites récepteurs présents à la membrane tendent à être saturés alors que la concentration de neurotensine [NT] (nM) est augmentée. Résultats obtenus de duplicatas pour quatre expérimentations distinctes.

Le graphique obtenu a permis l'extrapolation des valeurs de Bmax et de Kd associées aux résultats. Ainsi, le Bmax moyen de quatre répliques de la condition NC1 est de 171,7 fmol/mg prot., alors que celui de la condition traitée au DsiRNA SgIII 1890 est de 94,8 fmol/mg prot. Lorsque les valeurs des répliques sont comparées entre elles, cela donne un écart de Bmax significativement différent (résultats non montrés, test de Mann-Whitney  $*p < 0,05$ ). Puisque le Bmax reflète le nombre de sites récepteurs spécifiques présents à la membrane, il est possible de conclure que l'invalidation de la protéine SgIII a tendance à limiter l'adressage du récepteur NTS2 à la membrane (Rang & Dale, 2012).

La constante de dissociation (Kd) tend elle aussi à diminuer avec la condition SgIII 1890, c'est-à-dire qu'elle est en moyenne de 7,5 nM pour la condition NC1 et de 2,8 nM pour SgIII 1890. Lorsque les valeurs des répliques sont comparées, cela apparaît également comme une

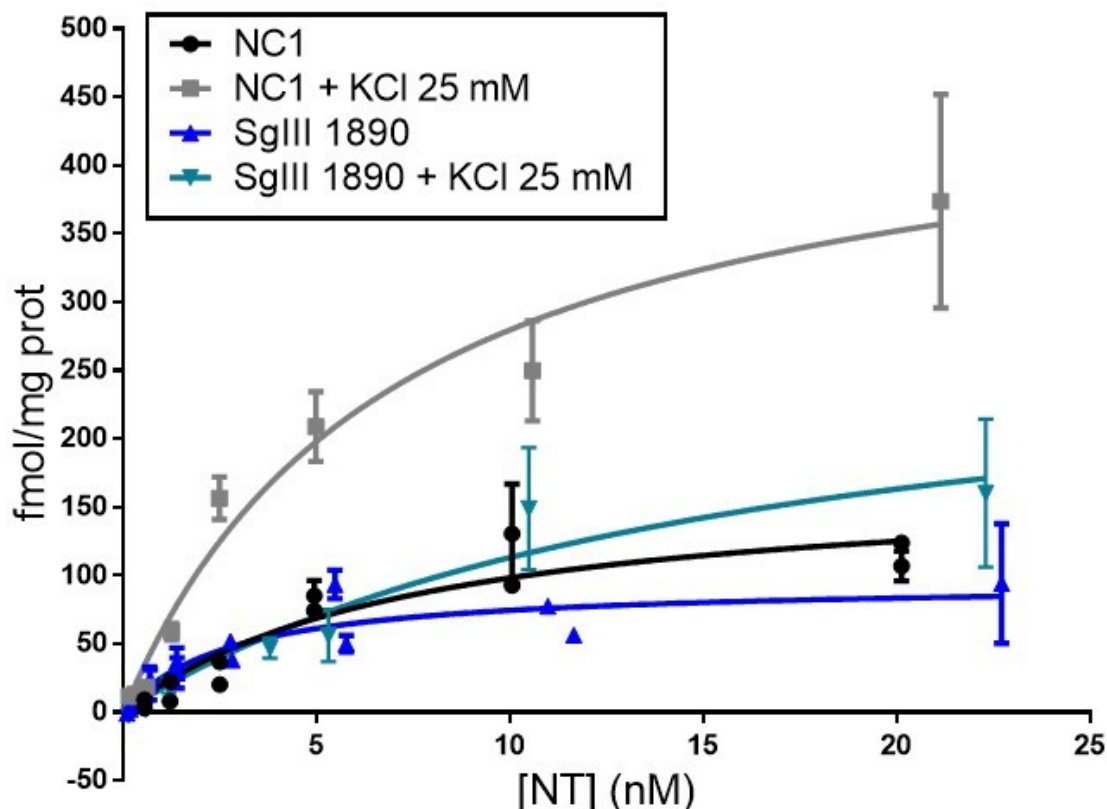
différence statistiquement significative (test de Mann-Whitney  $*p < 0,05$ ). Le  $K_d$  représente la concentration du ligand qui occupe 50% des récepteurs, et donne donc une idée de l'affinité du ligand pour le récepteur (Kenakin, 2012). On pourrait donc penser que l'interaction avec la protéine SgIII vienne influencer des paramètres associés au  $K_d$ , comme la structure du récepteur. En absence de la protéine SgIII, une diminution du  $K_d$  signifie que la neurotensine se lierait avec plus d'affinité sur NTS2, malgré une baisse du nombre de sites récepteurs à la membrane. Cependant, bien que les différences de  $K_d$  soient statistiquement significatives, il ne s'agit pas d'une différence biologiquement significative, puisqu'on demeure dans l'intervalle d'affinité observé pour le récepteur NTS2, selon les types cellulaires et les conditions. Malgré tout, c'est un phénomène curieux qui ajoute à l'intérêt de mieux comprendre les effets modulateurs de SgIII sur le récepteur NTS2.

### ***3.2.3 Effets de différents stimuli sur l'adressage du récepteur NTS2***

Puisque la voie de sécrétion régulée est recrutée en réponse à une stimulation externe, il était pertinent de vérifier l'effet de différents stimuli sur l'adressage membranaire du récepteur. Les stimuli ont été choisis en fonction de la nature neuronale des cellules, et du contexte physiologique à l'étude.

#### ***3.2.3.1 Dépolarisation induite par le chlorure de potassium (KCl)***

Le chlorure de potassium induit une dépolarisation membranaire, et permet donc de mimer une transmission nerveuse physiologique. Dans le but de déterminer si ce phénomène pouvait induire l'adressage du récepteur NTS2, les cellules DRG F11 ont été mises en contact avec 25 mM de KCl pendant 30 minutes (Figure 39).

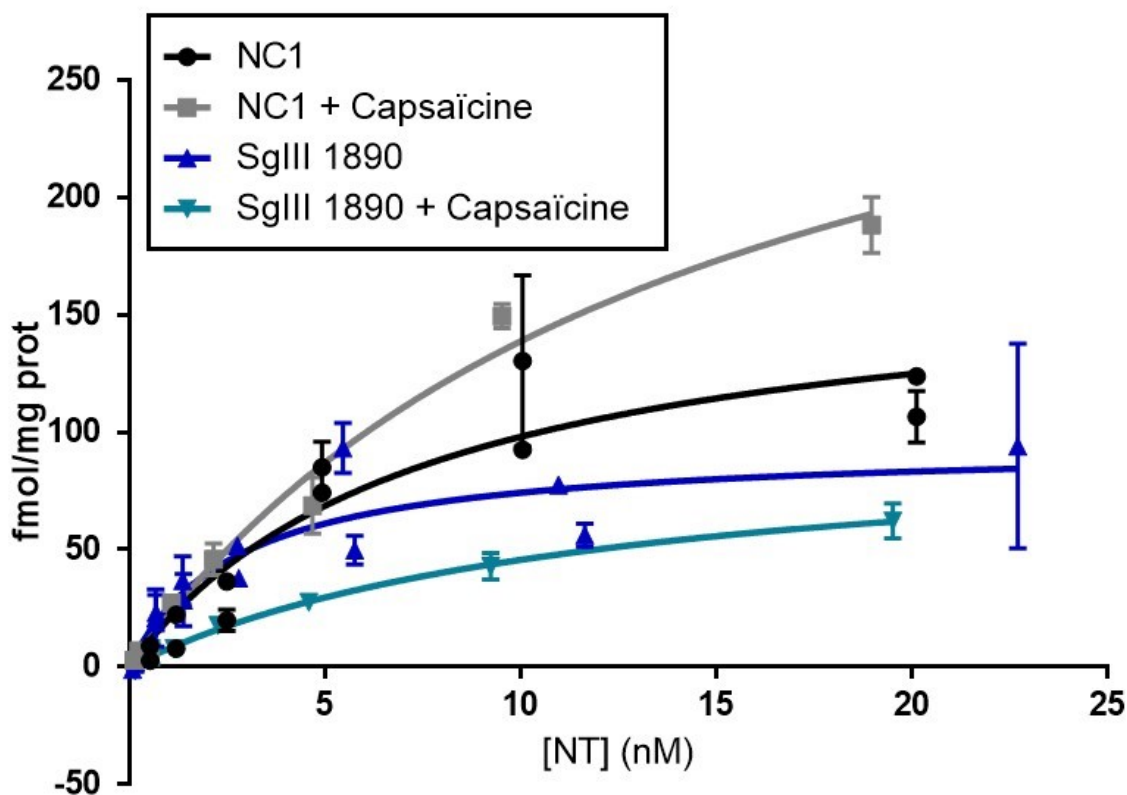


**Figure 39 : Effet d'une dépolarisation au KCl sur la liaison de la NT-I<sup>125</sup>.** Le KCl fait augmenter la quantité de sites récepteurs NTS2 à la membrane. L'inactivation de SgIII limite cette réponse au stimulus, puisque la condition SgIII 1890 + KCl demeure au même niveau que la condition non stimulée (NC1). Résultats obtenus de duplicatas pour quatre expérimentations distinctes.

Les résultats montrés à la figure 39 témoignent de la capacité du récepteur NTS2 à répondre à une dépolarisation membranaire induite par le KCl, puisqu'on y observe un adressage augmenté. En effet, la condition NC1 + KCl 25 mM présente un Bmax de 474,7 fmol/mg prot., ce qui est près de 3 fois supérieur au Bmax de la condition NC1 sans stimulation (171,7 fmol/mg prot.). De plus, l'inactivation de la protéine SgIII limite cette réponse à la dépolarisation, étant donné que la condition SgIII 1890 + KCl 25 mM montre un Bmax de 292,6 fmol/mg prot. Bien que celui-ci soit supérieur à la valeur de la condition SgIII 1890 sans stimulation (94,8 fmol/mg prot.), il n'accède tout de même pas au Bmax atteint par la condition NC1 + KCl 25 mM.

### 3.2.3.2 Dépolarisation induite par la capsaïcine

La capsaïcine a été utilisée afin de représenter un stimulus de nature nociceptive. Celle-ci induit une dépolarisation membranaire causée par l'entrée de cations dans le récepteur ionotrope TRPV1. Dans l'organisme, l'activation des récepteurs TRPV1 se traduit par une sensation de brûlure. Sur les cellules DRG F11, celle-ci a été employée à une concentration finale de 1  $\mu\text{M}$  pendant 30 minutes (Figure 40).

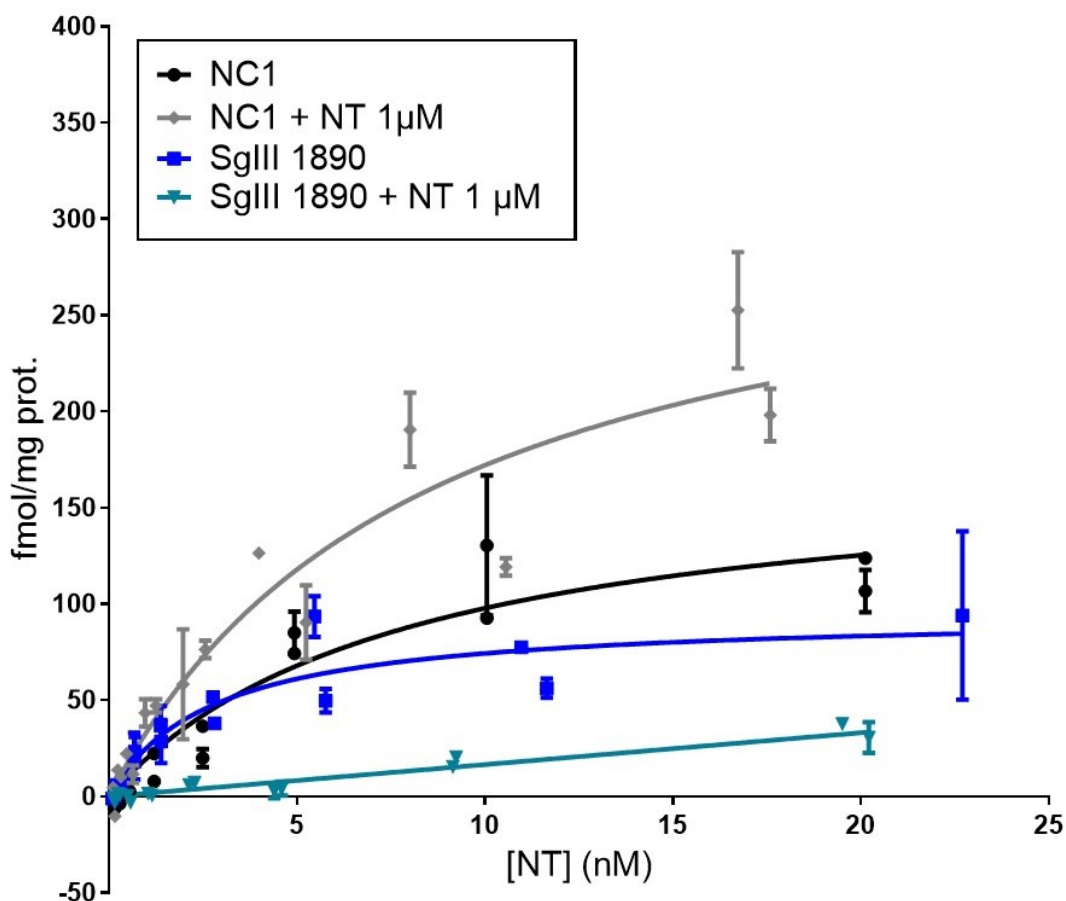


**Figure 40 : Effet d'une stimulation à la capsaïcine sur la liaison de la NT-I<sup>125</sup>.** La capsaïcine fait augmenter la quantité de sites récepteurs NTS2 à la membrane, alors que l'inactivation de SgIII limite cet adressage, même en condition de stimulation. Résultats obtenus de duplicatas pour quatre expérimentations distinctes.

Tel qu'obtenu avec la dépolarisation induite par le KCl, une dépolarisation membranaire causée par l'activation des récepteurs TRPV1 provoque également une hausse de l'adressage du récepteur NTS2. Le Bmax est effectivement de 342,5 fmol/mg prot., soit 2 fois supérieur à la condition NC1 sans stimulation (171,7 fmol/mg prot.). L'inactivation de SgIII inhibe l'adressage de SgIII, même en condition stimulée, où le Bmax de 99,5 fmol/mg prot. s'apparente fortement au Bmax de la condition sans stimulation (94,8 fmol/mg prot.).

### 3.2.3.3 Stimulation à la neurotensine

Il a déjà été démontré par Perron et collaborateurs en 2006 que la stimulation de cellules avec 1  $\mu\text{M}$  de neurotensine toute la nuit induisait un adressage soutenu du récepteur NTS2. La même expérimentation a donc été reproduite avec les cellules DRG F11, dans un essai de radioliation en saturation (Figure 41).



**Figure 41 : Effet d'une stimulation à la neurotensine sur la liaison de la NT-I<sup>125</sup>.** Le ligand naturel du récepteur NTS2 fait augmenter son adressage à la surface cellulaire. L'inactivation de SgIII limite cette réponse au stimulus, puisqu'on y observe une liaison de type non spécifique dans la condition SgIII 1890 + NT. Résultats obtenus de duplicatas pour quatre expérimentations distinctes.

Comme les travaux précédents le stipulaient, une stimulation à la neurotensine 1  $\mu\text{M}$  a effectivement induit l'adressage du récepteur NTS2, près de 2 fois plus important que la condition sans stimulation (318,5 fmol/mg prot. versus 171,7 fmol/mg prot.). Concernant la condition SgIII 1890 + neurotensine, il est surprenant d'observer une droite de liaison qui ne

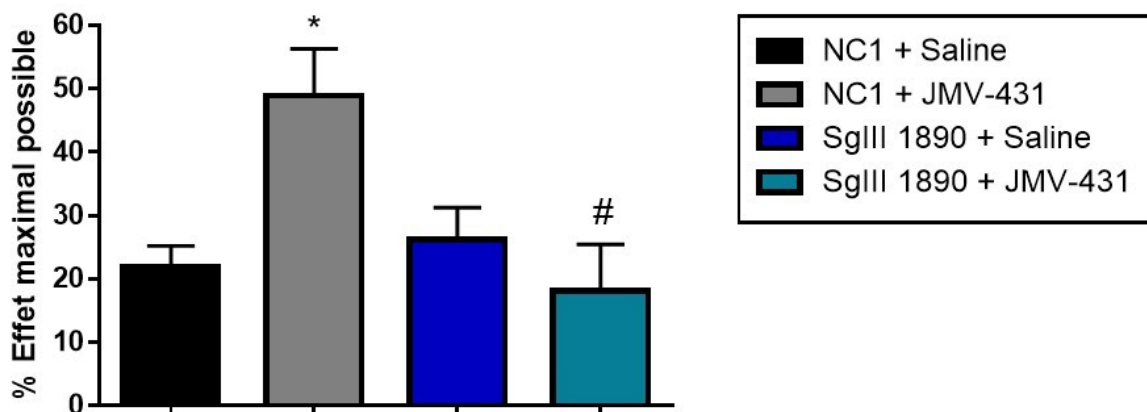
parvient pas à saturer. En effet, l'absence de saturation signifie que la radioactivité retenue par les cellules n'est pas réellement imputable à la présence du récepteur, et que ce-dernier serait donc absent de la membrane cellulaire. Il est difficile d'interpréter ce résultat en regard de celui obtenu avec le DsiRNA SgIII 1890 seul, qui démontre tout de même une faible présence de NTS2 à la surface cellulaire ( $B_{max} = 94,8 \text{ fmol/mg prot.}$ ). Ce phénomène pourrait peut-être s'expliquer par l'internalisation et la relocalisation du récepteur vers des compartiments de dégradation lorsque celui-ci est stimulé par son ligand, comme c'est le cas pour certains RCPG (Hill, 2006; Tian *et al.*, 2014). L'absence de la protéine SgIII dans ce scénario limiterait alors l'adressage ou même le recyclage du récepteur NTS2 vers la surface cellulaire. L'ajout d'un inhibiteur de l'internalisation (sucrose hyperosmolaire) ou du protéasome (lactacystine, bortézomib) dans cet essai permettrait d'éclaircir la probabilité de cette hypothèse (Bonifacino & Traub, 2003; Rang *et al.*, 2013; Sarret *et al.*, 2002).

### **3.3 Modulation de l'interaction NTS2-SgIII dans le modèle de douleur aiguë chez le rat**

Afin de valider les résultats obtenus dans le modèle de cellules neuronales exprimant le récepteur NTS2, un protocole expérimental d'administration des DsiRNAs chez l'animal a été élaboré. Pour vérifier l'impact d'une invalidation de la protéine SgIII sur les fonctions analgésiques de différents récepteurs, le test de retrait de la queue a été choisi afin de représenter un modèle de douleur aiguë chez le rat mâle Sprague-Dawley.

#### **3.3.1 Conséquences d'une invalidation de SgIII sur les fonctions analgésiques de NTS2**

Les propriétés analgésiques du JMV-431, un agoniste NTS2-sélectif, sont déjà bien caractérisées dans la littérature. Ce composé a donc été sélectionné afin de valider les effets d'une invalidation de la protéine SgIII sur les fonctions antinociceptives associées au récepteur NTS2 (Figure 42).



**Figure 42 : Impact de l'inactivation de SgIII sur les propriétés analgésiques du JMV-431 au test de retrait de la queue.** Pourcentage d'effet maximal possible (%MPE) calculé avec les valeurs à 30 minutes post-injection. Le JMV-431 induit une augmentation du %MPE significativement supérieur par-rapport à la saline (\*), alors que le traitement au DsiRNA SgIII 1890 renverse complètement cet effet analgésique (#). Test de Kruskal-Wallis. Comparaison de NC1 + JMV-431 par-rapport à NC1 + Saline  $*p < 0,05$ . Comparaison de SgIII 1890 + JMV-431 versus NC1 + JMV-431  $\#p < 0,05$ . Groupes de 6 animaux minimum, résultats représentatifs de trois essais distincts.

Les résultats présentés à la figure 42 viennent donc appuyer le phénomène observé *in vitro*, comme quoi l'inactivation de la protéine SgIII limite encore davantage la présence du récepteur NTS2 à la membrane plasmique. Selon les résultats exprimés en %MPE, le groupe NC1 + Saline, qui représente un double contrôle, démontre une réponse basale de 22% en termes d'effet maximal possible. En effet, si on considère la valeur basale (temps 0) représentative d'un %MPE de 0%, on observe toujours une légère augmentation du temps de latence au cours du test, même chez le groupe contrôle. Ce phénomène peut être causée par de l'analgésie induite par le stress (Lafrance *et al.*, 2010), ou par une habitude à l'expérimentation. Concernant le groupe NC1 + JMV-431, le %MPE atteint des niveaux de 48%. Cette valeur est significativement différente du résultat obtenu chez le groupe NC1 + Saline (\*), ce qui indique un effet antinociceptif efficace. Ensuite, le groupe SgIII 1890 + Saline présente un %MPE semblable au groupe double contrôle (26%). Il était effectivement attendu que l'inactivation de SgIII n'aurait pas d'effets sur la réponse basale au test de retrait de la queue. Par contre, l'inactivation de SgIII dans le groupe SgIII 1890 + JMV-431 a bel et bien un effet sur l'analgésie normalement induite par le JMV-431, puisqu'on y retrouve

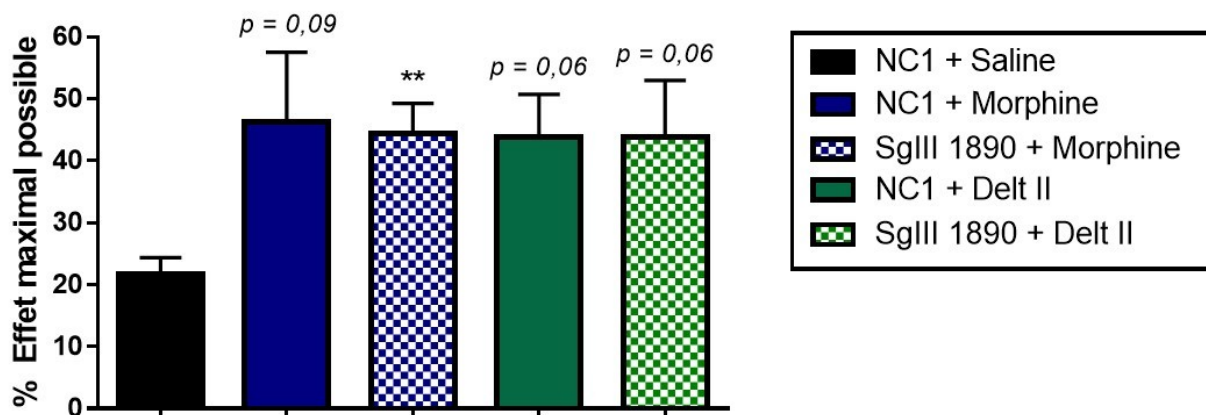
un %MPE de seulement 18%. Cela représente donc une différence de 30% avec le groupe NC1 + JMV-431, qui est statistiquement significative (#).

En somme, ces résultats indiquent que la protéine SgIII joue effectivement un rôle important dans l'adressage du récepteur NTS2, et que l'invalidation de celle-ci limite la présence du récepteur à la membrane. Dans ce cas, cela se traduit par une absence de l'effet antinociceptif normalement inféré par l'agoniste NTS2-sélectif, le JMV-431.

### ***3.3.2 Conséquences d'une invalidation de SgIII sur l'intégrité des voies de sécrétion***

Pour vérifier s'il y avait une altération des voies de sécrétion cellulaire suivant l'invalidation de la protéine SgIII, la capacité des récepteurs opioïdes  $\mu$  et  $\delta$  à induire une analgésie au test de retrait de la queue a été évaluée. Les propriétés antinociceptives de la morphine, agoniste du récepteur opioïde  $\mu$ , ont d'abord été caractérisées suivant une injection intrathécale de 1  $\mu$ g/rat (Figure 43). Cet essai nous a permis de vérifier l'intégrité de la voie de sécrétion constitutive, qui ne devrait normalement pas être affectée par la diminution de l'expression de la protéine SgIII. En parallèle, le même essai a été réalisé avec la deltorphine II (Delt II), agoniste sélectif du récepteur  $\delta$ , injectée par voie intrathécale à raison de 10  $\mu$ g/rat. Puisque le récepteur opioïde  $\delta$  emprunte la voie de sécrétion régulée, l'expérimentation nous a donné l'opportunité d'évaluer les effets d'une invalidation de SgIII sur la formation des LDCV de la voie de sécrétion régulée.





**Figure 43 : Impact de l'invalidation de la protéine SgIII sur les propriétés analgésiques des récepteurs opioïdes  $\mu$  et  $\delta$ .** La morphine et la deltorphine (Delt II) induisent une augmentation du pourcentage d'effet maximal possible par-rapport à la saline (NC1 + Saline), à 30 minutes du test de retrait de la queue. Test de Kruskal-Wallis,  $^{***}p < 0,01$ . Groupes de 6 animaux minimum, résultats représentatifs de deux essais distincts.

À la figure 43, on démontre d'abord que l'invalidation de la protéine SgIII n'a aucun impact sur l'analgésie induite par la morphine, qui présente un %MPE de 46% avec le DsiRNA NC1 et de 44% avec le DsiRNA SgIII 1890. Ces résultats étaient attendus et servaient également de contrôle, puisque le récepteur opioïde  $\mu$  emprunte la voie de sécrétion constitutive pour être adressé à la surface cellulaire.

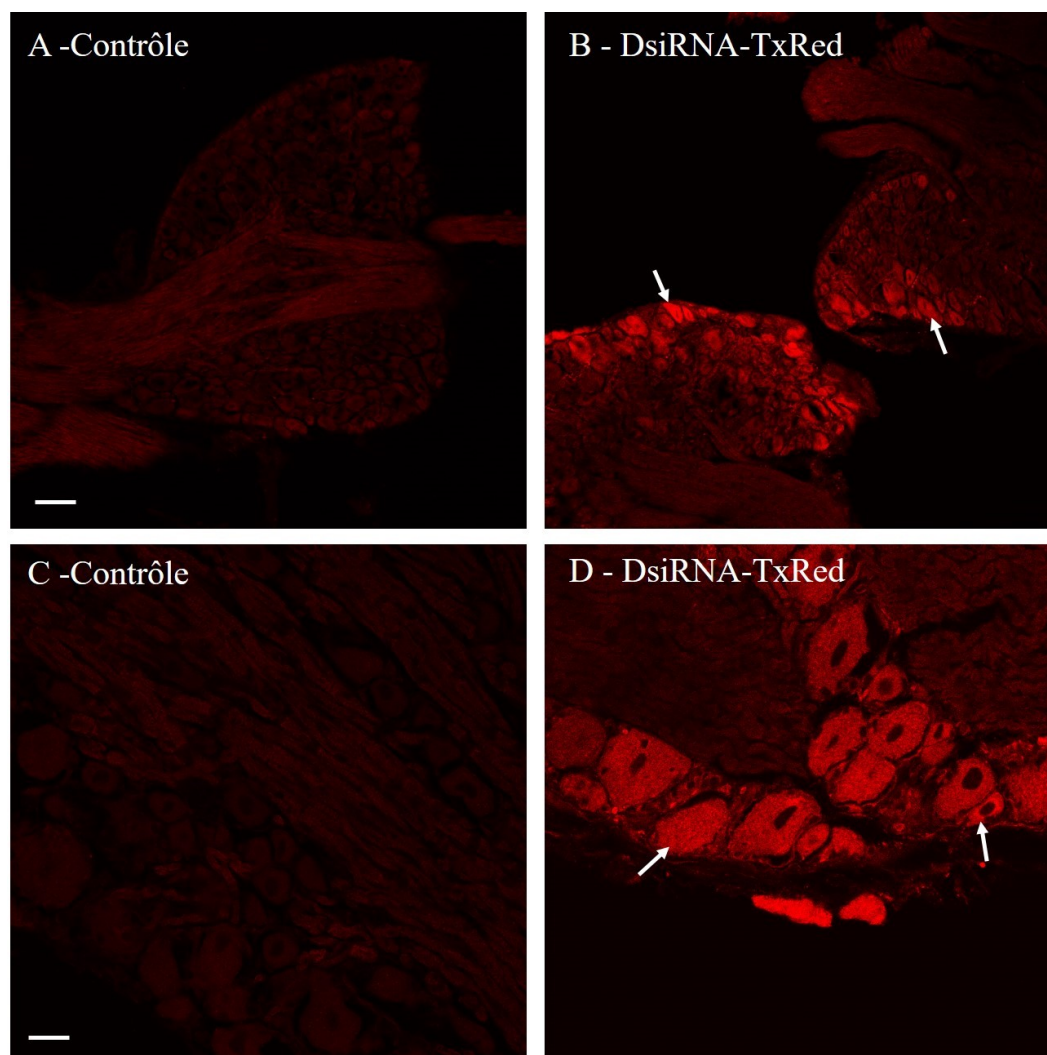
De plus, les effets antinociceptifs de la deltorphine (Delt II) ne sont pas affectés par le traitement au DsiRNA SgIII, puisque le %MPE ne change pas entre les conditions NC1 et SgIII 1890, qui sont tous deux de 43%. Cela signifie que le récepteur opioïde  $\delta$  peut encore être adressé à la membrane plasmique et répondre à une stimulation à la Delt II, même lorsque l'expression de la protéine SgIII est diminuée.

### 3.3.3 Analyses moléculaires des tissus récoltés

Afin de valider la pénétrance des DsiRNAs dans les tissus cibles, des coupes de ganglions de la racine dorsale (DRG) provenant d'animaux traités au DsiRNA couplé au fluorophore Texas Red (TxRed) ont été effectuées et observées au microscope confocal. La capacité des DsiRNAs SgIII 1890 à diminuer l'expression de la protéine SgIII a également été vérifiée dans les moelles épinières et les DRG prélevés suite aux expérimentations comportementales. De ces tissus, l'ARN et les protéines ont été extraits pour procéder à des analyses par PCR quantitative et immunobuvardage.

### 3.3.3.1 Captage des DsiRNAs par les tissus cibles

Des DsiRNAs-TxRed ont été injectés par voie intrathécale chez des rats Sprague-Dawley selon le même protocole employé pour les DsiRNAs NC1 et SgIII 1890. La capacité des DRG L4 à L6 à internaliser les complexes formés des DsiRNAs et de l'agent de transfection Transductine a été caractérisée en observant l'émission du fluorophore Texas Red par microscopie confocale sur les coupes de tissus (Figure 44). En parallèle, les mêmes expérimentations ont été effectuées avec des tissus provenant d'animaux traités à la saline à titre de contrôle.

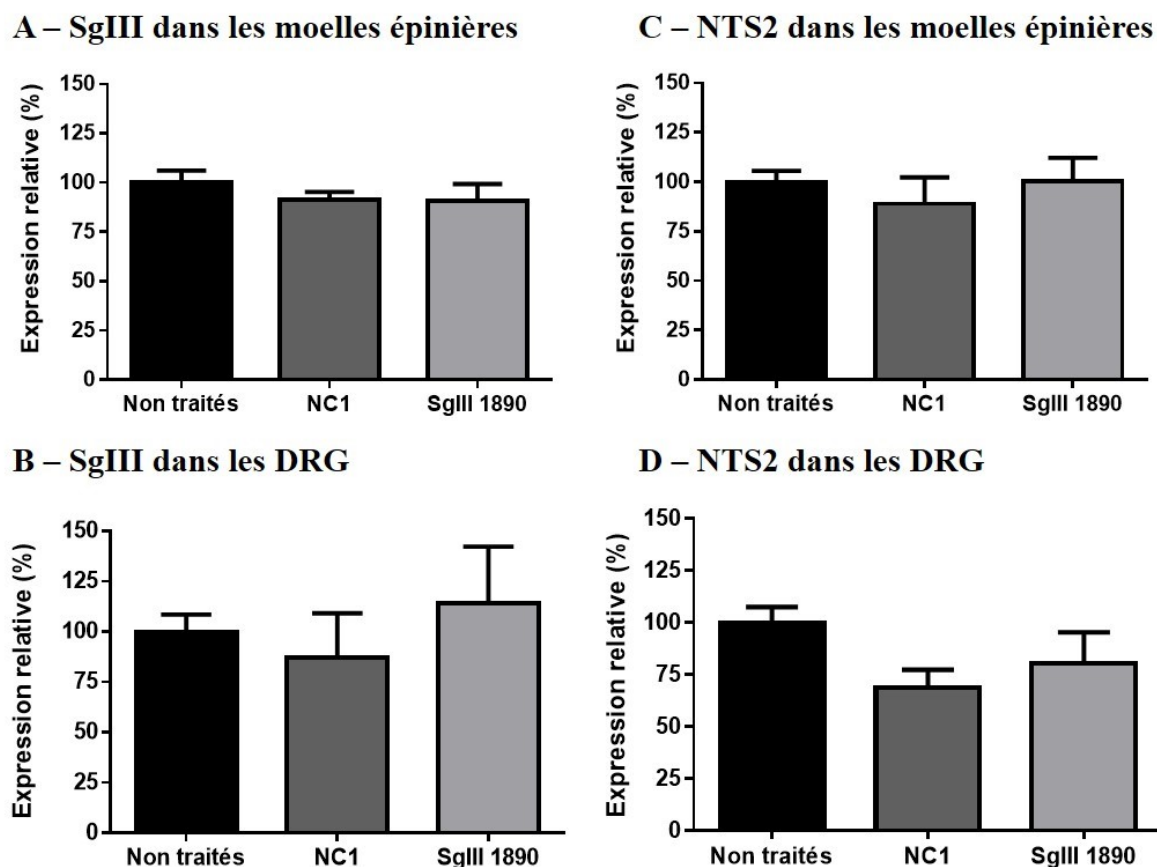


**Figure 44 : Captage des DsiRNAs par les tissus cibles.** Les DRG L4 à L6 provenant d'animaux traités au DsiRNA-TxRed (B et D) présentent des cellules marquées par le fluorophore Texas Red, en comparaison avec les DRG provenant d'animaux contrôles traités à la saline (A et C). Échelles : (A-B) : 50  $\mu$ m, (C-D) : 20  $\mu$ m. Images représentatives d'acquisitions effectuées en triplicata, provenant des DRG de deux animaux différents par condition.

À la figure 44, il est possible de noter la différence de marquage entre les images captées à partir des DRG d'animaux traités au DsiRNA-TxRed et les DRG d'animaux contrôles traités à la saline. En effet, on observe de la fluorescence émise par les corps cellulaires sur les images de droite (B et D), alors que les contrôles (A et C) n'en présentent pas. Cela signifie que les DsiRNAs-TxRed complexés à la Transductine sont bien aptes à atteindre les cellules des ganglions de la racine dorsale lorsqu'injectés par voie intrathécale.

### 3.3.3.2 Expression de l'ARNm

Les niveaux d'ARNm de SgIII et de NTS2 ont donc été évalués par PCR quantitatif, à l'aide des gènes de référence HPRT et ODC (Figure 45).



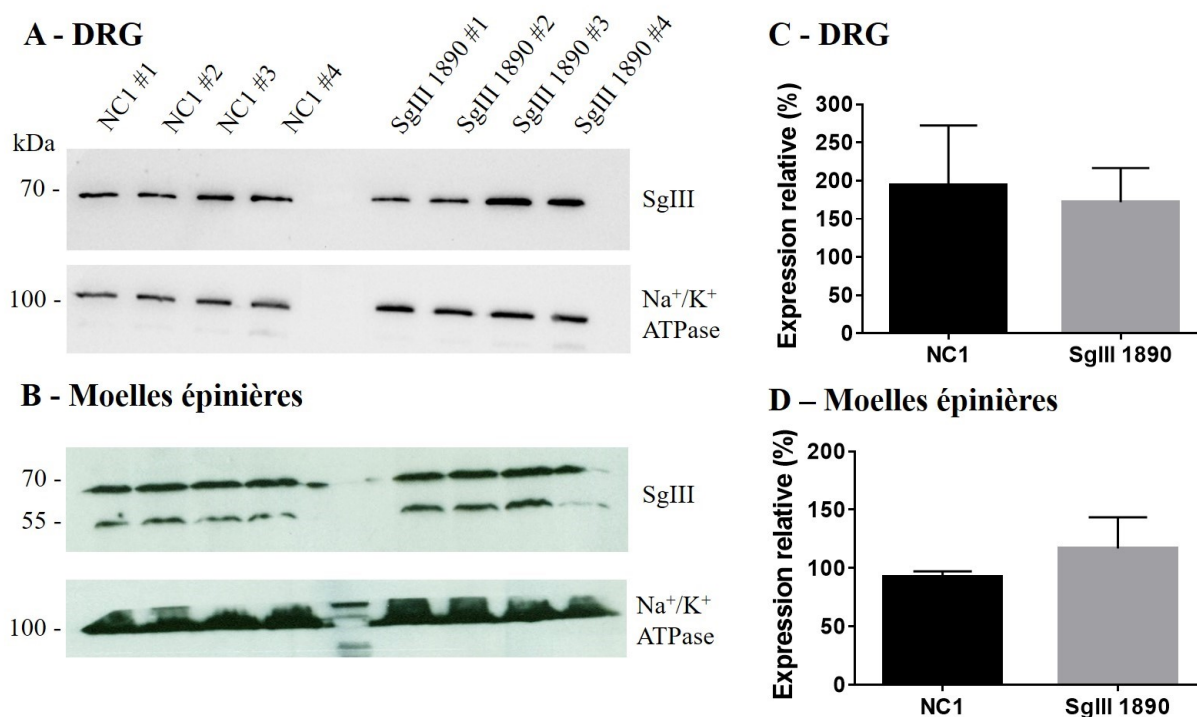
**Figure 45 : Expression de l'ARNm de SgIII et NTS2 dans la moelle épinière et les ganglions de la racine dorsale des animaux traités aux DsiRNAs.** (A-D) L'expression de l'ARNm de SgIII et de NTS2 n'est pas modulée par les traitements aux DsiRNAs NC1 ou SgIII 1890, par-rapport à des animaux naïfs non traités, dans la moelle épinière et les DRG. Groupes de 4 échantillons minimum, résultats représentatifs de trois essais distincts.

Les niveaux d'ARNm de SgIII et NTS2 sont donc représentés à la figure 45 sous forme de pourcentages d'expression relative, calculés en fonction des contrôles (animaux non traités) normalisés à 100% d'expression. On remarque qu'il n'y a aucune variation significative entre les conditions, autant pour NTS2 que pour SgIII, que ce soit dans les moelles épinières ou les DRG.

### 3.3.3.3 *Expression protéique*

Pour quantifier les niveaux d'expression de la protéine SgIII dans les tissus récoltés, des essais d'immunobuvardage ont été réalisés à l'aide de l'anticorps anti-SgIII (lapin). L'anticorps anti- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase a également servi comme protéine de référence pour réaliser la quantification, puisqu'il s'agissait de préparations de membranes (Figure 46).

La figure 46 illustre sensiblement les mêmes résultats qu'obtenus au qPCR. En effet, il n'y a aucune différence dans l'expression de la protéine SgIII dans les moelles et DRG des animaux, entre les conditions NC1 et SgIII 1890. Cette figure permet cependant de représenter la grande variabilité entre les échantillons d'une même condition, par des écarts-types (SEM) de près de 75% pour la condition NC1 et 55% pour SgIII 1890 dans les DRG. Dans ce tissu, les niveaux protéiques avec le DsiRNA NC1 atteignent 194%, et 171% pour le DsiRNA SgIII 1890. Pour les moelles, les résultats de la condition NC1 sont plus homogènes, avec une valeur de 92% d'expression relative et un écart-type de plus ou moins 5%. Par contre, les moelles épinières des animaux traités au DsiRNA SgIII 1890 montrent une valeur moyenne de 116% et un écart-type de près de 30%, ce qui témoigne également d'une grande variabilité entre les différents échantillons, en plus d'une invalidation de SgIII d'apparence inefficace.



**Figure 46 : Expression protéique de SgIII dans la moelle épinière et les ganglions de la racine dorsale des animaux traités aux DsiRNAs.** (A-B) Les immunobuvardages anti-SgIII (lapin) et anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase ont été réalisés sur 4 échantillons de DRG et moelles épinières par condition (NC1 et SgIII 1890), où chaque échantillon représente un animal différent. Les résultats sont représentatifs d'essais effectués en triplicata. (C-D) La quantification du pourcentage d'expression relative a été effectuée par-rapport à la protéine de référence Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, et en normalisant à 100% d'expression la condition NC1. Les résultats représentent la moyenne de 4 échantillons par condition.

## DISCUSSION

La famille des RCPG représente le groupe le plus étendu et diversifié des récepteurs membranaires. Les substances pharmacologiques qui agissent sur ceux-ci induisent des actions thérapeutiques pour contrer plusieurs maladies humaines différentes, allant de la rhinite allergique à l'hypertension, de la schizophrénie à la douleur. Présentement, 30% des médicaments disponibles sur le marché agissent sur des RCPG (Hill, 2006). Bien que le *human genome project* ait identifié plus de 800 gènes de RCPG, les agents thérapeutiques actuels en cibleraient approximativement 30 seulement (Wise *et al.*, 2004). Ce constat indique qu'il existe encore une multitude de RCPG à explorer, qui pourraient démontrer un potentiel thérapeutique intéressant pour des pathologies sans traitement, ou pour lesquelles la thérapie est faiblement efficace et accompagnée d'effets secondaires.

La douleur chronique fait justement partie de ce dernier groupe, puisque les traitements analgésiques disponibles peuvent engendrer d'importants effets secondaires à long terme, particulièrement lorsque les doses sont augmentées suite à une diminution du soulagement de la douleur (Häuser *et al.* 2014; Lynch et Watson, 2006). Certains patients doivent donc vivre quotidiennement avec des effets secondaires indésirables, ou sont même réfractaires aux thérapies actuelles (Bjordal *et al.* 2007; de la Calle Gil *et al.*, 2015; Parkoohi *et al.*, 2015).

Dans le but éventuel de pallier à ce problème, le projet de ce mémoire consistait à mieux comprendre l'adressage membranaire du récepteur NTS2, un RCPG dont le ligand endogène est la neurotensine. Puisque des agonistes NTS2-sélectifs ont fait leurs preuves dans des modèles animaux de douleur aiguë, tonique et chronique (Roussy *et al.*, 2009, Sarret *et al.*, 2005, Smith *et al.*, 2012, Tétreault *et al.*, 2013), ce récepteur représente une cible potentielle pour la mise sur pied d'une toute nouvelle classe d'analgésiques. De plus, l'activation du récepteur NTS2 n'induit pas les effets hypothermiques et hypotenseurs qui sont normalement associés à l'injection de la neurotensine (Dubuc *et al.*, 1999a). Cela ajoute à l'intérêt d'étudier le récepteur NTS2 pour mener à la synthèse d'agents thérapeutiques qui n'induiraient pas d'autres effets physiologiques que celui recherché, soit un soulagement de la douleur.

Des études précédentes effectuées au laboratoire avaient mis en évidence une interaction entre le récepteur NTS2 et la protéine SgIII, une protéine résidente de la voie de sécrétion régulée. L'étude réalisée visait donc à identifier le rôle de cette protéine dans l'adressage membranaire du récepteur NTS2. Notre hypothèse de recherche était que cette interaction pouvait influencer l'activité fonctionnelle du récepteur en régulant son adressage à la membrane cytoplasmique et en affectant ses propriétés analgésiques. Les résultats obtenus ont effectivement permis de valider l'hypothèse émise, en démontrant que la diminution de l'expression de SgIII influence négativement l'activité fonctionnelle du récepteur. Pour le volet *in vitro* réalisé dans le modèle cellulaire neuronal, nous avons montré dans un premier temps l'interaction entre les protéines NTS2 et SgIII par colocalisation subcellulaire, GST pull down et FRET, en plus de la probabilité d'interaction entre les deux protéines dans le modèle impliquant les corps multi-vésiculaires. Par radiolisation en saturation, nous avons ensuite caractérisé les effets d'une invalidation de SgIII et de différents stimuli (KCl, capsaïcine et neurotensine) sur l'adressage du récepteur NTS2 à la membrane plasmique des cellules DRG F11. L'administration des DsiRNAs dirigés contre la protéine SgIII chez le rat ont finalement mis en lumière l'impact d'une invalidation de SgIII sur les propriétés analgésiques d'un agoniste NTS2-sélectif, dans le modèle de douleur aiguë du test de retrait de la queue.

## **4.1 Interaction NTS2-SgIII dans les cellules DRG F11**

### ***4.1.1 Forces et limites du modèle***

Le modèle de cellules DRG F11 a été choisi pour procéder aux expérimentations *in vitro* de ce projet. Dans la mesure où l'on s'intéresse à une protéine résidente de la voie de sécrétion régulée, il apparaissait primordial de choisir un type cellulaire qui possède cette voie de sécrétion (Kelly, 1985). Étant donné la distribution quasi ubiquitaire de la SgIII dans les cellules sécrétrices (Holthuis & Martens, 1996), il n'était pas étonnant de la retrouver exprimée de façon endogène dans les DRG F11. De plus, la lignée DRG F11 a été obtenue en partie d'une cellule neuronale sensorielle provenant d'un ganglion de la racine dorsale d'un rat. Puisque le projet porte sur une pathologie du circuit sensoriel nociceptif, cette caractéristique permettait de se rapprocher du contexte physiologique d'intérêt.

La cellule DRG F11 est un hybridome qui possède le contenu génétique de ses deux précurseurs, soit du DRG de rat et du neuroblastome de souris (Fan *et al.*, 1992, Platika *et al.*, 1985). Dans le cadre de ce projet, seules des séquences protéiques provenant de *rattus norvegicus* ont été utilisées pour la construction des plasmides transfectés. Ces dispositions présentent certains avantages, en constituant d'abord un système de transfection homologue. Dans un deuxième temps, cela rend la connexion entre les deux volets du projet plus crédible, puisqu'on demeure en tout temps dans un contexte physiologique de la même espèce. Connaissant le caractère inconstant du récepteur NTS2 selon les systèmes d'expression et les espèces (Tableau 4, Mazella et Vincent, 2006), ces conditions constituent une force majeure du modèle *in vitro*.

Cependant, ce modèle présente certaines limites, particulièrement concernant l'expression du récepteur NTS2. En effet, il n'existe aucune lignée cellulaire immortelle qui exprime le récepteur NTS2 de façon endogène, ce qui nous oblige à le transfecter. De plus, la transfection stable est excessivement difficile à réaliser, puisque les cellules rejettent rapidement le plasmide, et perdent donc le phénotype après quelques passages. L'idéal aurait été d'effectuer des cultures primaires, tel qu'accompli précédemment avec les cellules granulaires du cervelet de rat (Sarret *et al.*, 2002) ou encore avec les astrocytes provenant de cerveaux de rat (Nouel *et al.*, 1999). Cette avenue n'a pas été explorée de par la difficulté à entretenir des cultures primaires, la demande en optimisation et leur courte durée de vie. Malgré tout, le modèle cellulaire choisi s'est montré facile à transfecter de façon transitoire, en plus de montrer une interaction entre les protéines à l'étude.

#### **4.1.2 Colocalisation subcellulaire**

L'essai de colocalisation subcellulaire a été réalisé en premier lieu dans le but de valider la distribution du récepteur NTS2 exogène. Ainsi, les résultats obtenus par-rapport au marquage NTS2 ont conforté l'idée que le récepteur allait se comporter de façon fonctionnelle, et posséder les mêmes caractéristiques qu'observées par Sarret *et al.* en 2002 ou par Perron *et al.* en 2006. En effet, celui-ci démontre un signal concentré dans une région périnucléaire, qui pourrait vraisemblablement correspondre au TGN/Golgi. Bien que cet essai à lui seul ne puisse confirmer l'interaction entre les deux protéines, la quantification de colocalisation a donné des valeurs plutôt robustes, qui représentent une forte superposition des signaux correspondant aux deux protéines d'intérêt.



### 4.1.3 *GST pull down*

Le GST pull down est l'expérimentation qui a réellement pu démontré l'interaction entre la protéine SgIII endogène des cellules DRG F11 et la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur NTS2. Cet essai a l'avantage d'appuyer les résultats obtenus auparavant à l'aide du criblage double hybride, où la portion i3(NTS2) avait également été utilisée pour investiguer les partenaires d'interaction du récepteur. De plus, la recombinaison de cette petite séquence peptidique de 64 acides aminés (i3(NTS2)) à la GST permettait d'augmenter les chances de succès de l'essai. En effet, l'encombrement de protéines entières pourrait limiter le couplage de la construction GST aux billes. Dans notre cas, avec des protéines d'intérêt de plus de 400 résidus, l'usage de i3(NTS2) assurait une meilleure association avec les billes GS4B, une diminution du risque d'agrégation, en plus de limiter les interactions non spécifiques (Thermo Scientific Pierce Protein Biology, 2011).

Malgré tout, l'interaction non spécifique de la protéine SgIII avec la glutathionne des billes GS4B ou avec la GST seule a été vérifiée dans le but de s'assurer que la présence de SgIII sur l'immunobuvardage était bien le résultat d'une liaison à i3(NTS2)-GST. Dans les deux conditions, la révélation de SgIII dans le surnageant du pull down et son absence sur les billes vient ajouter à la crédibilité du résultat, en plus de démontrer que la protéine ne s'est pas agrégée aux billes.

L'agrégation des RCPG dans les essais d'interaction protéines-protéines, comme l'immunoprécipitation, est d'ailleurs un problème difficile à éviter (Binda & Parent, 2015). Les multiples domaines transmembranaires de ces récepteurs les rendent difficiles à se solubiliser, ce qui peut entraîner de faux positifs lorsque ceux-ci s'agglomèrent aux billes. L'essai de GST pull down permettait donc de s'affranchir en partie de ce phénomène.

Cependant, cet essai effectué sur un lysat cellulaire n'exclue pas la possibilité d'une interaction indirecte entre les deux protéines, où la révélation de SgIII pourrait être causée par un partenaire intermédiaire entre le récepteur NTS2 et la protéine SgIII. L'expérimentation pourrait être répétée avec de la SgIII purifiée afin de déterminer s'il s'agit d'une interaction directe entre les deux protéines. De plus, la production de la protéine i3(NTS2) dans les bactéries crée une limitation concernant les modifications post-traductionnelles normalement effectuées dans la cellule eucaryote. De cette façon, il y a des possibilités qu'i3(NTS2) n'adopte pas la même configuration 3D dans cet essai, que

lorsqu'elle est ancrée dans la membrane plasmique entre deux domaines transmembranaires. Cette conformation différente pourrait donc interférer, autant positivement que négativement, avec l'interaction entre la portion i3(NTS2) et d'autres protéines. Enfin, tout comme l'immunoprécipitation, le GST pull down crée un environnement synthétique d'interaction, où des protéines normalement séparées par les membranes des organelles peuvent être mises en contact. Malgré les résultats du pull down qui suggèrent une interaction SgIII-NTS2, il fallait alors caractériser cette interaction dans un contexte naturel dans la cellule entière.

#### ***4.1.4 FRET : Transfert d'énergie par molécules fluorescentes***

L'essai FRET par photoblanchiment de l'accepteur est une technique relativement simple qui offre l'opportunité de quantifier les probabilités d'interaction entre deux protéines, au sein de cellules entières. Quoique facile à réaliser avec les bons contrôles, cette technique est sensible à une multitude de facteurs, tels que les conditions de fixation et de préparation des échantillons, l'orientation relative des fluorophores, la nature transitoire de l'interaction, le pH du milieu d'interaction et même les vibrations ressenties par le microscope (Karpova & McNally, 2006). En ce qui nous concerne, les résultats obtenus semblent indiquer une faible interaction entre la protéine SgIII et le récepteur NTS2. Bien que les contrôles positifs et négatifs aient bien fonctionné, plusieurs aspects de la technique peuvent être encore optimisés pour augmenter la confiance accordée à ces résultats.

Premièrement, il ne faut pas oublier qu'il s'agit d'une démonstration d'interaction entre les protéines NTS2 et SgIII exogènes seulement. D'ailleurs, il était surprenant d'observer une distribution de YFP-rSgIII et CFP-rSgIII plutôt étendue à l'ensemble de la cellule, qui est très différente de la distribution normale de la protéine SgIII endogène révélée par immunofluorescence. Il se pourrait que les protéines CFP/YFP-rSgIII n'agissent pas de la même façon que la protéine SgIII endogène et n'interagissent donc pas avec le récepteur NTS2. Nous avons justement démontré à la figure 28 que le positionnement et la nature des étiquettes peuvent influencer grandement la fonctionnalité de certaines protéines. Pour régler ce problème, l'expérimentation pourrait être reproduite avec différents couples SgIII et NTS2 dont les étiquettes seraient placées alternativement en position N- ou C-terminale. Cela favoriserait peut-être également un rapprochement et un positionnement relatif adéquat des fluorophores.

Une autre option intéressante, qui permettrait de travailler avec la protéine SgIII endogène, serait l'utilisation d'un couple d'anticorps donneur/accepteur. Des anticorps secondaires couplés à la rhodamine et à la fluorescéine (FITC) pourraient par exemple permettre de vérifier l'interaction entre le récepteur NTS2 transfecté dans les cellules et la protéine SgIII endogène, tout en utilisant la même approche.

Aussi, dans le but de renforcer d'éventuels résultats qui indiqueraient une interaction entre le récepteur NTS2 et la protéine SgIII, il serait pertinent d'effectuer l'expérimentation avec un récepteur contrôle qui n'emprunte pas la voie de sécrétion régulée, comme MOP ou NTS1. L'absence d'interaction entre SgIII et l'un de ces récepteurs renforcerait la crédibilité de résultats positifs obtenus entre NTS2 et SgIII.

Enfin, il se pourrait très bien que l'interaction NTS2-SgIII soit trop rapide et transitoire pour être observable à l'échelle d'une cellule individuelle (Bacskai *et al.*, 2003; Karpova & McNally, 2006). Bref, il serait tout à fait possible d'améliorer l'essai à l'aide de ressources supplémentaires.

#### **4.1.5 Vérification du modèle d'interaction impliquant les corps multi-vésiculaires**

Les expérimentations effectuées pour vérifier le modèle d'interaction entre le récepteur NTS2 et SgIII permettent finalement de ne pas exclure l'hypothèse établie. Tout d'abord, la présence des deux protéines d'intérêt dans les préparations exosomales pointe vers un mécanisme de sécrétion impliquant les MVB, étant donné que la biogenèse des exosomes comprend justement cet intermédiaire de sécrétion (Keller *et al.*, 2006). Cette proposition est d'ailleurs renforcée par nos résultats préliminaires concernant la rétention de la neurotensine iodée sur les exosomes provenant de cellules exprimant le récepteur NTS2. Bien que l'expérimentation doive être répétée, celle-ci pointe déjà dans la même direction que notre hypothèse et que les autres données récoltées jusqu'à maintenant.

Une multitude d'études indiquent que les neurones peuvent sécréter des vésicules extracellulaires pour communiquer entre eux, ou avec d'autres cellules du système nerveux (Budnik *et al.*, 2016; Fauré *et al.*, 2006). Le transport de protéines et de micro ARNs régulateurs par l'entremise des exosomes jouerait notamment un rôle dans la fonction synaptique, le neurodéveloppement, la réponse immunitaire du système nerveux, le développement des neuroblastomes et les maladies neurodégénératives (Budnik *et al.*, 2016). Il a récemment été déterminé que certains récepteurs pouvaient également être excrétés dans

les exosomes neuronaux, tels que les complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC) et les récepteurs du EGF et du TNF (Janas *et al.*, 2016). Certaines vésicules extracellulaires neuronales contiennent aussi les sous-unités GluR2/3 du récepteur au glutamate (Fauré *et al.*, 2006).

Concernant les RCPG, des projets de caractérisation exosomale réalisés sur différents types cellulaires humains ont permis d'identifier une vingtaine de membres de cette famille. Parmi ceux-ci, on compte notamment le récepteur GRK6, retrouvé dans les exosomes des cellules cancéreuses ovariennes OVCAR-3 et IGROV1 (Liang *et al.*, 2013), alors que GRK5 a été découvert dans les exosomes provenant du thymus (Skogberg *et al.*, 2013). Dans les exosomes des cellules SH-SY5Y, dérivées d'un neuroblastome, les récepteurs GPR176 et ADGRL2 ont pu être identifiés (Keerthikumar *et al.*, 2015). Des exosomes exprimant le récepteur SSTR-2 humain ont même été injectés chez la souris dans le but de prélever des anticorps conformationnels dirigés contre ce RCPG (Estelles *et al.*, 2007). Bref, le transport exosomal n'est manifestement pas exclusif aux petites protéines, mais peut également assurer la sécrétion de récepteurs à 7 domaines transmembranaires. La capacité des RCPG exosomaux à être transférés d'une cellule à une autre ou à moduler l'activité d'une cellule réceptrice n'a cependant pas encore été démontré dans la littérature. Nos travaux pourraient ainsi constituer la première preuve de transférabilité d'un RCPG, et mener éventuellement à la caractérisation de l'impact physiologique de ce transfert sur l'homéostasie du système nerveux central.

D'après plusieurs études, la sécrétion d'exosomes par les cellules neuronales serait augmentée suite à une stimulation, comme la dépolarisation membranaire ou l'excitation par des ionophores calciques, des bloqueurs GABA, de l'AMPA ou du NMDA (Fauré *et al.*, 2006; Lachenal *et al.*, 2011). En sachant maintenant que le récepteur NTS2 démontre un adressage augmenté en condition de dépolarisation, la possibilité que les deux phénomènes soient étroitement liés prend davantage de crédibilité. L'effet des différents excitateurs de la relâche exosomale sur l'adressage du récepteur NTS2 chez les cellules DRG F11 pourrait ainsi représenter une piste d'exploration intéressante pour la suite du projet.

Puisque les exosomes sont reconnus pour leur fonction dans la communication intercellulaire, l'expérimentation de transférabilité du récepteur NTS2 a permis de renforcer encore davantage la probabilité du modèle proposé. En effet, les résultats de la figure 35

laissent supposer que près de 30% des récepteurs NTS2 peuvent transiter d'une cellule à l'autre par l'entremise du milieu extracellulaire, en admettant que les cellules-mères (rNTS2-YFP) présentent 100% d'expression du récepteur. Il existe d'ailleurs une foule d'études qui mettent en lumière le rôle cargo des exosomes. Par exemple, les neurones corticaux peuvent moduler l'expression du transporteur du glutamate EAAT2 (ou GLT1) chez les astrocytes, par la transmission d'un microARN contenu dans des vésicules extracellulaires (Morel *et al.*, 2013). Une autre expérience de transférabilité a été réalisée avec des oligodendrocytes en culture exprimant l'enzyme CRE recombinase (Frühbeis *et al.*, 2013). Une préparation exosomale de ces cellules était administrée dans le cervelet et l'hippocampe de souris knock-in exprimant un gène rapporteur CRE fluorescent. Suivant l'injection, les neurones des régions traitées exprimaient alors le gène rapporteur, indiquant un transfert efficace de l'enzyme CRE recombinase. Les vésicules extracellulaires peuvent même inférer de nouveaux comportements chez des organismes multicellulaires, comme le ver *C. elegans* (Wang *et al.*, 2014). Chez cet animal, les mâles possèdent 21 cellules neuronales spécialisées qui relâchent des exosomes contenant les protéines LOV-1 et PDK-2, responsables du comportement d'accouplement. Lorsqu'une préparation exosomale provenant de l'environnement de ces mâles était mise en contact avec des individus naïfs, ceux-ci adoptaient alors des comportements typiques de recherche de partenaire et de stratégies d'accouplement.

En regard de ces découvertes, il est probable que les vésicules extracellulaires n'aient pas encore dévoilé l'ensemble de leurs fonctions. Le transfert autocrine ou paracrine de récepteurs pouvant influencer la réponse du système nerveux face à une situation pathologique semble ainsi tout à fait probable. Concernant le récepteur NTS2, des évidences démontrent justement son expression astrocytaire suite à une lésion du système nerveux, ce qui pourrait être causé par un transfert provenant des cellules endommagées (Nouel *et al.*, 1999). Cependant, la façon dont ce mécanisme vient influencer la fonctionnalité de NTS2 reste encore à élucider, en plus du moment précis où celui-ci intervient dans l'adressage membranaire du récepteur. De plus, le modèle exposé à la figure 20 laisse entendre une fusion de l'exosome avec la membrane plasmique, ce qui induit l'expression membranaire du récepteur NTS2. Les résultats en microscopie obtenus suite à l'expérimentation de transfert montrent plutôt une expression cytoplasmique du récepteur chez les cellules réceptrices. Des

études approfondies concernant le mécanisme d'insertion du récepteur seraient à envisager, afin d'expliquer ces résultats et de potentiellement corriger le modèle proposé.

Pour corroborer les résultats obtenus, l'approche à privilégier serait d'abord celle de la microscopie électronique, où un immunomarquage aux billes d'or du récepteur NTS2 donnerait l'opportunité de vérifier sa présence dans les corps multi-vésiculaires. Pour ce faire, il faut cependant être apte à reconnaître les structures des MVB, en plus de développer une bonne maîtrise de la technique de microscopie électronique.

De plus, nous aimerions confirmer la présence du récepteur NTS2 dans les vésicules à corps dense de notre modèle cellulaire, en utilisant l'approche du fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose. Par immunobuvardage, il serait possible de révéler le récepteur NTS2 dans les fractions correspondant aux LDCV, identifiées à l'aide de marqueurs spécifiques comme la chromogranine B, la syntaxine 1B et Rab3 (Meldolesi *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2011).

## 4.2 Modulation de l'interaction NTS2-SgIII *in vitro* et *in vivo*

### 4.2.1 L'effet d'une invalidation de SgIII

Afin de déterminer le rôle de SgIII dans la fonctionnalité du récepteur NTS2, il était question dans un premier temps d'invalider cette protéine *in vitro* et *in vivo*. Nous avons opté pour une stratégie d'invalidation génique avec un outil d'interférence à l'ARN, puisque la méthode avait été optimisée au laboratoire précédemment. À l'aide d'un partenariat avec la compagnie IDT, des *Dicer-susbtate siRNAs* (DsiRNAs) dirigés contre différentes cibles avaient déjà été éprouvés dans un protocole d'étude comportementale chez l'animal (Doré-Savard *et al.*, 2008). Les DsiRNAs offrent l'avantage d'agir de façon locale et transitoire, en plus de limiter les effets non spécifiques et l'activation du système immunitaire (Behlke, 2008).

#### 4.2.1.1 Dans les cellules DRG F11

Avant d'effectuer l'essai d'invalidation dans les cellules DRG F11, nous ne savions pas encore si la protéine SgIII était responsable de la rétention du récepteur NTS2 au niveau du TGN, ou si celle-ci servait plutôt de chaperonne dans l'adressage vers la membrane plasmique. Concernant le premier mécanisme, il a été rapporté qu'une invalidation de SgIII

induisait la sécrétion constitutive de la chromogranine A, un partenaire d'interaction de SgIII qui emprunte normalement la voie de sécrétion régulée (Sun *et al.*, 2013). Un phénomène semblable s'observe avec la pro-opiomélanocortine (POMC) et la proenképhaline (PE), qui transitent également vers la voie de sécrétion constitutive lorsque leur protéine de triage, la carboxypeptidase E (CPE), est supprimée (Loh *et al.*, 2002). Dans ce cas, une augmentation de l'expression membranaire de NTS2 aurait pu être observée en absence de la protéine SgIII, si le récepteur avait effectué une transition vers la voie de sécrétion constitutive.

Comme les résultats le démontrent, l'invalidation de SgIII induit plutôt une diminution de la présence de NTS2 à la surface cellulaire, étant donné que les sites récepteurs saturent plus rapidement chez les cellules traitées au DsiRNA SgIII 1890. Le récepteur NTS2 serait donc inapte à transférer vers une voie de sécrétion alternative en absence de sa protéine de triage. Cette situation s'est déjà observée avec le récepteur opioïde  $\delta$  (DOP), un RCPG dont l'adressage régulé a largement été caractérisé. L'insertion de DOP à la membrane s'est montrée diminuée lorsque son partenaire de triage, la protachykinine, était invalidé (Guan *et al.*, 2005).

#### 4.2.1.2 Dans le modèle de douleur aiguë chez le rat

Après avoir observé une diminution de l'adressage de NTS2 lorsque SgIII était invalidée, nous étions curieux de connaître l'impact de ces changements d'expression membranaire sur l'activité fonctionnelle du récepteur.

L'invalidation de SgIII chez l'animal a donc permis de confirmer les observations effectuées *in vitro*, puisqu'un traitement au DsiRNA SgIII 1890 renverse les effets analgésiques normalement associés à l'injection de l'agoniste NTS2-sélectif JMV-431. Cela signifie que la diminution du nombre de récepteurs NTS2 à la membrane est suffisante pour influencer la transduction du signal en un message analgésique. Pour refaire le parallèle avec l'étude effectuée sur l'interaction entre la protachykinine et le récepteur DOP, les auteurs avaient également observé une diminution de la réponse analgésique à un agoniste DOP-sélectif chez les souris invalidées pour le gène de la protachykinine (Guan *et al.*, 2005).

Étant donné l'effet comportemental robuste du DsiRNA SgIII 1890 sur l'analgésie induite par le JMV-431, en plus de la capacité des DsiRNAs à pénétrer les tissus cibles, il aurait été vraisemblable d'observer une diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine SgIII dans les tissus récoltés. Nos résultats de qPCR ont même été répliqués par la

plateforme RNomique de l'Université de Sherbrooke (résultats non montrés). Cette dernière a confirmé la validité des amorces utilisées à amplifier le bon produit, ainsi que la reproductibilité des gènes de référence choisis (HPRT et ODC). Il se pourrait cependant que les résultats observés soient causés par une grande variabilité entre les échantillons. En effet, il arrivait que des animaux de la même condition présentent des différences d'expression relative oscillant entre 40% et 100%. Curieusement, les mêmes difficultés ont été rencontrées avec la chimiokine CCL2 et son récepteur CCR2, d'autres cibles d'intérêt du laboratoire. Leur invalidation *in vivo* par des DsiRNAs est impossible à démontrer par qPCR, alors que les effets comportementaux sont bien réels. L'utilisation d'une approche plus sensible, telle que la spectrométrie de masse, permettrait peut-être de déceler les différences d'expression des protéines à l'étude entre les différentes conditions. Nous travaillons d'ailleurs déjà en collaboration avec la compagnie PhenoSwitch Bioscience (Sherbrooke, Canada) afin d'optimiser cette méthode de quantification alternative.

Selon les résultats obtenus, nous nous sommes questionnés sur l'intégrité de la voie de sécrétion régulée suivant l'invalidation de la protéine SgIII. En effet, considérant son rôle important dans la formation des LDCV (Hosaka & Watanabe, 2010), il était pertinent de vérifier la sécrétion d'autres protéines empruntant cette voie de sécrétion.

Pour demeurer dans un paradigme d'évaluation comportementale de la douleur aiguë, nous avons choisi des récepteurs dont l'activation induit de l'analgésie chez l'animal, soit  $\mu$  et  $\delta$  opioïde. Tel qu'attendu, le traitement avec les DsiRNAs dirigés contre SgIII n'a eu aucun effet sur l'analgésie induite par la morphine, agoniste principal du récepteur  $\mu$ , puisque ce récepteur emprunte la voie de sécrétion constitutive (Zhang & Bao, 2012). Étant donné que le récepteur  $\delta$  opioïde est adressé en partie par la voie de sécrétion régulée, un dysfonctionnement de cette voie aurait pu se traduire par une diminution de la réponse analgésique suite à un traitement à la deltorphine II, agoniste DOP-sélectif. Les résultats démontrent cependant que l'invalidation de SgIII n'affecte aucunement les propriétés antinociceptives de la Delt II.

Évidemment, la quantification de l'expression de SgIII dans les tissus des animaux ne démontrant pas d'invalidation, il nous est nécessaire de demeurer prudents quant à l'interprétation des résultats obtenus aux essais comportementaux. Comme il n'y a aucune



information sur une interaction DOP-SgIII dans la littérature, nous pourrions entre autres confirmer les résultats obtenus *in vivo* à l'aide d'un essai de radioliation en saturation effectué sur des cellules DRG F11 exprimant le récepteur DOP de façon stable. Avec la Delt II comme ligand radioactif, il serait possible d'évaluer rapidement les effets d'un traitement aux DsiRNAs dirigés contre la protéine SgIII sur les valeurs de Bmax. Ce type de méthode a l'avantage d'être déjà optimisée au laboratoire, surtout que l'invalidation de SgIII a bien été démontrée dans les cellules DRG F11 suite au traitement avec les DsiRNAs.

En admettant que les DsiRNAs dirigés contre SgIII parviennent bien à invalider, ou du moins diminuer, l'expression de la protéine *in vivo*, l'hypothèse pour expliquer ce résultat pourrait s'appuyer sur la redondance du système de sécrétion régulée, qui peut continuer de fonctionner en l'absence d'une seule granine. En effet, des souris avec des mutations dans le gène de la protéine SgIII n'ont démontré aucun changement notable dans leur viabilité, fertilité et locomotion (Kingsley *et al.*, 1990). De la même façon, des souris invalidées pour les gènes des chromogranines A et B n'ont montré aucun phénotype létal, en plus d'une sécrétion neuroendocrinienne normale (Diaz-Vera *et al.*, 2010; Hendy *et al.*, 2006). Dans ce cas, une expression augmentée des autres membres de la famille des granines était observée, comme quoi le système de formation des LDCV possède un fort potentiel adaptatif. Plus récemment, Sun et collaborateurs ont montré que la SgII pouvait prendre le relai sur SgIII lorsque cette dernière était invalidée dans les cellules hypophysaires AtT-20 (Sun *et al.*, 2013). En regard de cette explication, le mécanisme de sécrétion régulée serait apte à continuer d'adresser le récepteur DOP, car la formation des granules de sécrétion ne reposerait pas uniquement sur l'interaction SgIII-CgA (Gomi *et al.*, 2015). Il se pourrait aussi qu'il existe différentes sous-populations de vésicules au sein de la même cellule, n'exprimant pas toujours la protéine SgIII. Par exemple, il a été démontré que la substance P pouvait être co-sécrétée avec le CGRP, la galanine, la somatostatine et le BDNF au niveau des afférences sensorielles primaires (Zhang *et al.*, 2010). Cela signifie que les LDCV d'une même cellule peuvent présenter des contenus extrêmement hétérogènes, selon les conditions. Dans le cas du récepteur NTS2, son interaction spécifique avec la protéine SgIII implique cependant une absence de triage vers la voie de sécrétion régulée lorsque son partenaire protéique est supprimé, ce qui se traduit par une perte des effets analgésiques normalement associés à l'injection d'une agoniste sélectif du récepteur NTS2. Cette possibilité d'interaction

spécifique a d'ailleurs été vérifiée de façon préliminaire par alignement des séquences de la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur NTS2 de rat avec les boucle i3 des RCPG identifiés comme pouvant emprunter la voie de sécrétion régulée (résultats non montrés, RCPG énumérés en p.32). Comme aucune identité n'a été détectée entre les séquences à l'aide de l'outil BLAST (NCBI, MD, USA), on peut s'imaginer que NTS2 représente effectivement le seul RCPG qui entretient une interaction avec SgIII par l'entremise de sa 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire.

À titre de perspective du projet, l'identification des domaines protéiques précis responsables de cette interaction pourraient être effectuée. Une approche par mutagenèse dirigée dans la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur NTS2 ou dans la séquence de la SgIII nous permettrait de déterminer l'impact de ces mutations sur l'interaction entre les deux protéines, évalué d'abord par immunoprécipitation ou GST pull down. Une autre méthode envisageable est la génération de peptides qui viendraient bloquer l'interaction entre les deux protéines, par correspondance avec les domaines d'interaction du récepteur NTS2 et de la protéine SgIII. Par la suite, les mutants présentant une perte d'interaction pourraient être testés quant à leur effet sur l'adressage membranaire du récepteur, par essai de radioliation en saturation sur cellules entières. Cet essai nous donnerait notamment une indication sur la nature directe ou indirecte de l'interaction. En effet, une diminution de l'adressage du récepteur NTS2 lorsque le partenariat protéique avec la protéine SgIII est perdu laisserait supposer que les deux protéines doivent interagir de façon directe afin de porter NTS2 à la surface cellulaire.

Il serait aussi envisageable de réaliser des essais de superfusion sur les DRG de rat afin de doser la relâche de neuropeptides, comme le CGRP ou la substance P, qui transitent également par les LDCV (Dansereau *et al.*, 2008; Steenwinckel *et al.*, 2011). Cet essai permettrait de poser un second regard sur l'état du système de sécrétion régulée suite à la de la protéine SgIII chez l'animal.

#### **4.2.2 Les effets de différents stimuli sur l'adressage du récepteur NTS2**

Les essais d'invalidation de la protéine SgIII *in vitro* et *in vivo* nous ont apporté de précieuses informations sur le rôle de celle-ci dans l'adressage du récepteur NTS2. En effet, l'absence de SgIII limite l'expression membranaire du récepteur, ce qui se traduit par une inhibition de ses effets fonctionnels antinociceptifs chez l'animal. Dans l'optique d'un

traitement analgésique basé sur un agoniste NTS2-sélectif, c'est évidemment l'effet contraire qui serait recherché, soit une augmentation de la présence du récepteur à la membrane. Il était donc question de caractériser les facteurs aptes à moduler à la hausse l'expression membranaire du récepteur.

Ainsi, le KCl, la capsaïcine et la neurotensine ont induit une augmentation de la présence du récepteur NTS2 à la membrane des DRG F11. Selon un mode de sécrétion régulée classique, ces stimuli seraient à l'origine de la fusion des LDCV avec la membrane plasmique, alors que celles-ci sont amarrées à la membrane par des protéines d'ancrage (Vázquez-Martínez *et al.*, 2012). Ce phénomène, qu'on appelle *docking*, signifie que les vésicules sont prêtes à relâcher leur contenu de façon extrêmement rapide. Cela indique également que la hausse de sécrétion du récepteur NTS2 après stimulation n'est pas causée par une synthèse protéique *de novo*, étant donné que les vésicules de sécrétion sont déjà formées et prêtes à fusionner. Ce constat a d'ailleurs été vérifié par Perron et collaborateurs, qui n'ont pas observé de différence dans l'adressage du récepteur NTS2 chez des cellules stimulées avec la neurotensine pendant 24 heures, et incubées avec de la cycloheximide, inhibiteur de la synthèse protéique (Perron *et al.*, 2006).

Ces observations s'appliquent également dans un contexte de sécrétion régulée où il y aurait implication des corps multi-vésiculaires et d'une relâche par les exosomes. Tel que mentionné précédemment, l'excrétion d'exosomes neuronaux est sensible à une multitude de stimuli, dont la dépolarisation membranaire et une activation récepteur-dépendante (Fauré *et al.*, 2006; Lachenal *et al.*, 2011).

D'un point de vue physiologique, on peut donc s'imaginer que la transmission de certains signaux sensoriels mène à l'adressage du récepteur NTS2. Dans les ganglions de la racine dorsale du rat, NTS2 est majoritairement exprimé par les petites et grosses cellules, associées respectivement aux fibres C et aux fibres A $\beta$  (Sarret *et al.*, 2005). Les résultats obtenus permettent d'établir différentes hypothèses quant au rôle régulateur du récepteur NTS2.

Les fibres A $\beta$  transmettent principalement les informations non nociceptives, mais participent aussi à la modulation de la douleur en activant des interneurons inhibiteurs (Beaulieu *et al.*, 2005). Ce phénomène, appelé théorie du portillon, implique une inhibition locale de la transmission nociceptive des fibres A $\delta$  et C par l'intermédiaire des interneurons

inhibiteurs (Melzack & Wall, 1965). Dans la mesure où NTS2 est adressé à la suite d'une dépolarisation (KCl), son expression dans les gros DRG pourrait témoigner d'un rôle dans la modulation indirecte de la transmission nociceptive. Il est d'ailleurs connu que la stimulation électrique transcutanée à basse intensité (TENS), une stimulation non douloureuse qui active les fibres A $\beta$ , recrute le système de contrôle du portillon (Garrison & Foreman, 1994). L'analgésie induite par le TENS a été associée en partie aux récepteurs opioïdes et de l'adénosine, quoiqu'il demeure encore des zones d'ombre autour de ce mécanisme (Chandran & Sluka, 2003; Koninck, 1997; Marchand *et al.*, 1995). L'implication du récepteur NTS2 dans ce phénomène pourrait donc représenter une piste d'investigation future intéressante.

Les fibres C, quant à elles, répondent à des stimulations nociceptives thermiques, chimiques et mécaniques, en plus d'exprimer fortement le récepteur TRPV1 (Beaulieu *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2004). Puisque l'activation des canaux TRPV1 par la capsaïcine induit l'adressage du récepteur NTS2, on pourrait penser que son expression dans les petits DRG puisse servir à une modulation directe de la transmission douloureuse. Un comportement de ce type s'observe notamment avec le récepteur opioïde  $\delta$ , dont la présence à la surface cellulaire des fibres C est augmentée dans des conditions d'inflammation périphérique (Brederson & Honda, 2015).

À ce jour, nous n'avons toujours pas identifié les protéines G couplées au récepteur NTS2. La seule information dont nous disposons est la capacité du récepteur NTS2 de rat à activer la voie des MAPK lorsqu'il est exprimé de façon endogène dans les cellules granulaires du cervelet (Sarret *et al.*, 2002) ou de façon stable dans les cellules CHO (Gendron *et al.*, 2004). De plus, l'étude de Gendron *et al.* a montré que la phosphorylation de ERK1/2 était dépendante de l'internalisation de NTS2, ce qui suggère un phénomène indépendant des protéines G, et plutôt associé aux  $\beta$ -arrestines (Ferguson, 2001). Il est donc difficile pour le moment de caractériser la façon dont le récepteur NTS2 pourrait induire l'activation des fibres A $\beta$  et l'inhibition des fibres C, et par quelles voies de signalisation les effets fonctionnels observés sont engendrés. De plus, la lignée cellulaire DRG F11 est une population à phénotypes hétérogènes, représentant différents sous-types de neurones sensoriels (Boland & Dingleline, 1990). Les phénomènes observés *in vitro* ne peuvent donc pas être associés à un type de fibre précise. À partir de DRG de rat, nous pourrions trier les petits, moyens et gros DRG selon leur taille et les déposer en culture (Scroggs & Fox, 1992).

Par des techniques électrophysiologiques, il serait possible de mesurer l'activation ou l'inhibition de différents courants suite à l'application d'un agoniste NTS2-sélectif, ce qui donnerait des indices quant à la fonction modulatrice du récepteur sur les différentes fibres sensorielles (Belkouch *et al.*, 2011; Belkouch *et al.*, 2014).

### 4.3 Perspectives du projet

Ce mémoire a permis de répondre à une partie des interrogations soulevées concernant le trafic cellulaire du récepteur NTS2, en plus d'atteindre les objectifs qui avaient été fixés. Évidemment, certaines expérimentations supplémentaires permettraient de renforcer les résultats obtenus, en plus de répondre à de nouvelles questions qui sont survenues au cours du projet.

#### 4.3.1 Étude des corps multi-vésiculaires

Dans un premier temps, il serait nécessaire de confirmer la présence de NTS2 et de SgIII dans les exosomes par microscopie électronique. Cette technique consiste effectivement en l'approche la plus fiable pour identifier les corps multi-vésiculaires et les vésicules extracellulaires (Thery *et al.*, 2006). Pour ce faire, il serait possible d'effectuer un immunomarquage du récepteur NTS2 et de la protéine SgIII avec des particules d'or sur les cellules DRG F11 exprimant le récepteur, sur des tissus nerveux de rat ou encore sur des préparations exosomales. Cette expérimentation aurait l'avantage de confirmer ou infirmer le modèle d'interaction NTS2-SgIII proposé, en plus de déterminer la possibilité que la protéine SgIII puisse se retrouver à l'intérieur des exosomes. En effet, le modèle illustré à la figure 20 pose un problème quant au positionnement de SgIII dans l'exosome, après retournement de la vésicule dans le MVB. Logiquement, la protéine SgIII devrait alors être située en-dehors de l'exosome. Advenant l'identification des deux partenaires protéiques à l'intérieur des exosomes, il nous faudrait alors élucider le mécanisme qui permet à la protéine SgIII de s'y retrouver.

Dans un deuxième temps, plusieurs modifications pourraient être apportées au protocole actuel pour améliorer la pureté des exosomes extraits. D'après Lobb et collaborateurs, l'ultrafiltration représente une alternative efficace, plus rapide et qui altère moins l'intégrité des vésicules extracellulaires (Lobb *et al.*, 2015). De plus, les auteurs considèrent l'utilisation

de troussees commerciales comme des options intéressantes, quoique coûteuses et souvent équivalentes aux techniques classiques.

Il existe aussi une multitude de marqueurs exosomaux autres que TSG101 qui permettraient de renforcer la crédibilité des résultats. Il serait notamment possible d'utiliser des anticorps dirigés contre les tetraspanines (CD63 et CD81) et la protéine ALIX pour identifier la présence des exosomes neuronaux dans les extraits purifiés (Budnik *et al.*, 2016). Ces marqueurs pourraient également servir au triage des exosomes par FACS, ce qui renforcerait la pureté de nos échantillons (Pospichalova *et al.*, 2015).

Enfin, il serait intéressant de vérifier la transférabilité du récepteur NTS2 entre les cellules neuronales DRG F11 et d'autres types cellulaires, comme la lignée humaine astrocytaire 1321N1 ou murines microgliales BV2 et N9. La communication exosomale des neurones vers les astrocytes a effectivement déjà été démontrée, et pourrait donc être reproduite dans notre essai avec le récepteur NTS2 (Morel *et al.*, 2013). Un transfert du récepteur NTS2 des neurones vers les astrocytes fournirait également une piste pour expliquer son expression chez les cellules gliales lors d'une lésion (Nouel *et al.*, 1999). Le mécanisme menant au transfert serait cependant à élucider, dans la mesure où le récepteur NTS2 est seulement identifié chez les neurones en condition basale (Sarret *et al.*, 2003). En effet, considérant le modèle exposé à la figure 20, il est difficile d'expliquer pourquoi les cellules environnantes ne seraient pas également réceptrices des exosomes exprimant le récepteur NTS2 produits par les neurones. Puisque la composition protéique et lipidique de la membrane de l'exosome peut influencer son captage par les cellules ciblées, il se pourrait que les neurones soient aptes à produire des exosomes exclusivement captés par les neurones (Mulcahy *et al.*, 2014). Concernant les exosomes des microglies, des évidences témoignent de leur rôle dans la modulation de l'activité synaptique neuronale (Antonucci *et al.*, 2012). La communication inverse n'a cependant pas encore été observée. En somme, ces essais pourraient ouvrir la voie vers l'étude du rôle de NTS2 dans l'homéostasie du système nerveux central en réponse à certaines perturbations.

#### **4.3.2 Induction de l'adressage de NTS2 chez l'animal**

Comme la neurotensine induit l'adressage du récepteur NTS2 de façon soutenue (Perron *et al.*, 2006), il serait envisageable d'utiliser ce mécanisme pour potentialiser les effets analgésiques aigus d'un agoniste NTS2-sélectif. On peut notamment se baser sur le

comportement du récepteur opioïde  $\delta$ , dont l'activation par la deltorphine II est peu efficace dans des tests de douleur aiguë chez des animaux naïfs (Cahill *et al.*, 2001). En effet, des traitements répétés à la morphine permettent d'induire l'insertion de DOP à la membrane plasmique, en plus d'un effet analgésique puissant aux tests de la plaque chaude et de la formaline (Cahill *et al.*, 2001). La Delt II est également apte à provoquer l'adressage membranaire du récepteur dans les petits DRG de souris (Bao *et al.*, 2003). En utilisant le rat comme modèle, nous pourrions injecter un composé neurotensinergique par voie intrathécale à doses croissantes, et à quatre reprises espacées de 12 heures. Douze heures suivant la dernière injection, le test de retrait de la queue serait effectué avec un agoniste NTS2-sélectif, comme le JMV-431. Une augmentation de l'adressage du récepteur NTS2 se traduirait par une analgésie potentialisée chez les animaux pré-traités au composé, comparé à un groupe pré-traité à la saline selon le même protocole d'injection. Étant donné que les agonistes NTS2-sélectifs ont déjà des propriétés analgésiques de façon basale, nous pourrions notamment diminuer les doses nécessaires à l'observation d'un effet antinociceptif.

#### **4.3.3 Le récepteur NTS2 en condition de douleur chronique**

La régulation de l'adressage du récepteur NTS2 par des facteurs extracellulaires indique que celui-ci est potentiellement sensible à des perturbations de l'environnement, comme une condition de douleur chronique. Une fois de plus, il est possible de faire le parallèle avec le récepteur  $\delta$  opioïde, dont l'expression membranaire est augmentée lors de stress tissulaires ou de douleur chronique inflammatoire et neuropathique (Brederson & Honda, 2015; Cahill *et al.*, 2003; Gendron *et al.*, 2006; Mika *et al.*, 2001). Cette hausse d'adressage membranaire de DOP se traduit par des effets antinociceptifs augmentés suite à l'injection d'un agoniste sélectif chez les animaux lésés, par-rapport aux individus sains. Il serait possible de vérifier l'implication du récepteur NTS2 dans la douleur chronique, grâce aux modèles de douleur neuropathique, inflammatoire et cancéreuse, déjà bien maîtrisés au laboratoire (Doré-Savard *et al.*, 2010; Parent *et al.*, 2012; Tétreault *et al.*, 2011; Tétreault *et al.*, 2013). Ces modèles induisent notamment le développement d'une sensibilité thermique et mécanique augmentée, observable aux tests comportementaux de Hargreaves et de Randall Selitto respectivement. À l'aide de ces tests, nous pourrions comparer les effets analgésiques d'un agoniste NTS2-sélectif entre des animaux atteints de douleur chronique, et des animaux sains. Une potentialisation des effets antinociceptifs chez les animaux atteints de douleur chronique

témoignerait du rôle de NTS2 dans le mécanisme de réponse endogène à la douleur. Un tel résultat pourrait supporter grandement la recherche sur cette cible thérapeutique potentielle, en plus de contribuer à la compréhension du système neurotensinergique en général.



## **Conclusion**

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était de caractériser le rôle de l'interaction NTS2-SgIII dans la fonctionnalité du récepteur, tout en approfondissant nos connaissances sur les facteurs pouvant moduler l'adressage de NTS2. Les résultats obtenus à l'aide des essais d'invalidation ont effectivement permis de démontrer la dépendance du récepteur envers la protéine SgIII dans son trafic intracellulaire. De plus, les expérimentations de stimulation cellulaire ont donné des pistes de solution pour augmenter la présence de NTS2 à la membrane plasmique. En parallèle, l'étude des exosomes a ouvert la voie sur un mécanisme sécrétoire particulier qui mérite d'être étudié davantage, et qui pourrait représenter la première démonstration de transférabilité d'un RCPG d'une cellule à l'autre. En somme, ce projet contribue à l'avancement des connaissances en lien avec l'adressage membranaire des RCPG en général, particulièrement au niveau du mécanisme de sécrétion régulée, tout en fournissant de nouvelles informations sur la façon de potentialiser les effets thérapeutiques analgésiques du récepteur NTS2.

## REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de recherche, Philippe Sarret. Je suis particulièrement reconnaissante de l'écoute et de la confiance dont j'ai bénéficié tout au long de mes stages au baccalauréat, de mes crédits de recherche et de ma maîtrise. Grâce à cela, j'ai pu sentir que mes idées étaient prises en compte, et ça a beaucoup contribué à m'approprier le projet et avoir du plaisir à le réaliser, malgré les difficultés rencontrées. Je ne peux aussi passer à côté de l'incroyable liberté que tu m'as accordée, en me laissant travailler comme auxiliaire d'enseignement à de nombreuses reprises. Je te remercie ainsi de m'avoir donné l'opportunité de développer des compétences qui me seront extrêmement utiles pour la carrière à laquelle j'aspire.

Je voudrais également remercier chaleureusement tous les membres de l'équipe, soit plus de 25 étudiant(e)s, stagiaires post-doctoraux et employé(e)s que j'ai eu la chance de côtoyer depuis mon premier stage en 2011. Grâce à vous, j'ai connu un environnement de travail incroyable, en plus de conserver plusieurs souvenirs inoubliables. Je remercie plus particulièrement Louis Doré-Savard, mon premier superviseur de stage, qui m'avait sélectionnée en entrevue des stages COOP, en plus de Pascal Tétreault et Alexandre Parent, superviseurs de mon 2<sup>e</sup> stage, qui ont su m'inculquer d'excellentes valeurs scientifiques. Merci à Myriam Lemire et Jean Lainé de m'avoir transmis le flambeau de ce projet en particulier. Je remercie aussi sincèrement Elie Besserer-Offroy, l'homme le plus en demande de l'IPS, qui m'a offert généreusement de son temps pour m'apprendre de nouvelles techniques, ou pour cogiter sur mes résultats. Merci enfin à Jean-Michel Longpré pour tes précieux conseils, tes bonnes idées et ton coup de main dans la gestion de tout !

J'adresse des remerciements un peu spéciaux à mes amies, Virginie et Julie, avec qui nous avons traversé tous les stades de la maîtrise ensemble. C'était agréable de partager les hauts et les bas des études graduées avec vous. Merci pour le support moral, les pratiques de séminaire, les séances de yoga et les soupers de filles. Nos chemins se séparent, mais vous resterez des amies précieuses, et je vous souhaite beaucoup de succès dans vos nouveaux projets !

Merci infiniment à ma famille, Nathalie, David, Raphaëlle et Guillaume, de m'avoir épaulé tout au long de mes études. J'ai toujours apprécié votre soutien inconditionnel et votre intérêt pour mes passions. Merci de me poser des questions sur ce que je fais et de faire des efforts pour comprendre. Cela signifie beaucoup pour moi d'avoir pu partager mes avancements avec vous, même si je suis dans un domaine qui vous est peu commun. Un merci plus particulier à ma sœur Raphie, qui ne m'a pas reniée malgré ses convictions et son grand amour des animaux. Merci pour votre ouverture d'esprit et vos encouragements du début à la fin.

Je souhaite évidemment remercier mon complice de vie, Émile-Jacques. Merci d'avoir écouté mes problèmes et de m'avoir supportée dans mes décisions difficiles. Je te remercie aussi de m'encourager dans mes plans de carrière, et de me donner le courage de me lancer vers de nouveaux défis. Tu m'as beaucoup aidé à prendre confiance en moi, et à garder un équilibre sain entre les études et ma vie personnelle. Je suis vraiment reconnaissante d'avoir eu quelqu'un à qui me confier en rentrant du laboratoire, que ce soit pour te partager des résultats intéressants, ou pour me plaindre de mes Western qui ne marchaient pas. D'ailleurs, je suis vraiment chanceuse que tu comprennes mon jargon scientifique, mais encore plus que tu t'y sois intéressé. Merci d'être là pour moi et d'être mon supporteur #1 !

Finalement, j'aimerais remercier Louis Gendron et Jean-Luc Parent d'avoir accepté de constituer mon jury pour évaluer ce mémoire. Je vous remercie pour votre intérêt envers ce projet de maîtrise, en plus du temps investi dans la lecture et la correction de ce document.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Ab Aziz, C. B., & Ahmad, A. H. (2006). The role of the thalamus in modulating pain. *Malays J Med Sci*, 13(2), 11-18.
- Achour, L., Labbé-Jullié, C., Scott, M. G. H., & Marullo, S. (2008). An escort for GPCRs: Implications for regulation of receptor density at the cell surface. *Trends Pharmacol Sci*, 29(10), 528–535.
- Amar, S., Kitabgi, P., & Vincent, J. P. (1986). Activation of phosphatidylinositol turnover by neurotensin receptors in the human colonic adenocarcinoma cell line, 201(1), 31-36.
- Antonucci, F., Turola, E., Riganti, L., Caleo, M., Gabrielli, M., Perrotta, C., ... Verderio, C. (2012). Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *Embo J*, 31(5), 1231–1240.
- Arvan, P., & Castle, D. (1998). Sorting and storage during secretory granule biogenesis: Looking backward and looking forward. *The Biochemical Journal*, 332, 593–610.
- Bacsikai, B. J., Skoch, J., Hickey, G. A., Allen, R., & Hyman, B. T. (2003). Fluorescence resonance energy transfer determinations using multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy to characterize amyloid-beta plaques. *J Biomed Optics*, 8(3), 368–375.
- Bandelow, B. (2015). Generalized anxiety disorder and pain. *Mod Trends Pharmacopsychiatri*, 30, 153-165.
- Bao, L., Jin, S. X., Zhang, C., Wang, L. H., Xu, Z. Z., Zhang, F. X., ... Zhang, X. (2003). Activation of delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide secretion. *Neuron*, 37(1), 121–133.
- Beaulieu, P. (dir.) et collaborateurs. (2005). Pharmacologie de la douleur, Montréal, Qc : Les Presses de l'Université de Montréal, 593 pages.
- Behlke, M. A. (2008). Chemical modification of siRNAs for in vivo use. *Oligonucleotides*, 18(4), 305–319.
- Belkouch, M., Dansereau, M. A., Réaux-Le Goazigo, A., Van Steenwinckel, J., Beaudet, N., Chraïbi, A., Mélik-Parsadaniantz, S., & Sarret, P. (2011). The chemokine CCL2 increases Nav1.8 sodium channel activity in primary sensory neurons through a Gβγ-dependent mechanism. *J Neurosci*, 31(50), 18381–18390.

- Belkouch, M., Dansereau, M.-A., Tétreault, P., Biet, M., Beaudet, N., Dumaine, R., Chraïbi, A., Mélik-Parsadaniantz, S., & Sarret, P. (2014). Functional up-regulation of Nav1.8 sodium channel in A $\beta$  afferent fibers subjected to chronic peripheral inflammation. *J Neuroinflammation*, 11(45), 1-17.
- Benmoussa, M., Chait, A., Loric, G., & De Beaurepaire, R. (1996). Low doses of neurotensin in the preoptic area produce hyperthermia. Comparison with other brain sites and with neurotensin-induced analgesia. *Brain Res Bull*, 39(5), 275–279.
- Bennett, G. J., & Xie, Y. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33, 87–107.
- Bjordal, J. M., Johnson, M. I., Lopes-martins, R. A. B., Bogen, B., Chow, R., & Ljunggren, A. E. (2007). Short-term efficacy of physical interventions in osteoarthritic knee pain. A systematic review and meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *BMC Musculoskelet Disord*, 8(51), 1–14.
- Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77(3), 1496–1500.
- Boland, L. M., & Dingleline, R. (1990). Expression of sensory neuron antigens by a dorsal root ganglion cell line, F-11. *Brain Res Dev Brain Res*, 51(2), 259–266.
- Bonifacino, J. S., & Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*, 72, 395–447.
- Botto, J. M., Sarret, P., Vincent, J. P., & Mazella, J. (1997a). Identification and expression of a variant isoform of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor in the mouse central nervous system. *FEBS Lett*, 400(2), 211–214.
- Botto, J., Guillemare, E., Vincent, J., & Mazella, J. (1997b). Effects of SR 48692 on neurotensin-induced calcium-activated chloride currents in the *Xenopus* oocyte expression system: Agonist-like activity on the levocabastine-sensitive neurotensin receptor and absence of antagonist effect on the levocabastine insensitive neurotensin receptor. 223, 193–196.
- Botto, J. M., Chabry, J., Sarret, P., Vincent, J. P., & Mazella, J. (1998). Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 243, 585–590.
- Bouhassira, D., Bing, Z., & Le Bars, D. (1990). Studies of the brain structures involved in diffuse noxious inhibitory controls: the mesencephalon. *J Neurophysiol*, 64(6), 1712–1723.

- Boules, M., Liang, Y., Briody, S., Miura, T., Fauq, I., Oliveros, A., ... Richelson, E. (2010). NT79: A novel neurotensin analog with selective behavioral effects. *Brain Res*, 1308, 35–46.
- Brakch, N., Allemandou, F., Cavadas, C., Grouzmann, E., & Brunner, H. R. (2002). Dibasic cleavage site is required for sorting to the regulated secretory pathway for both pro- and neuropeptide Y. *J Neurochem*, 81(6), 1166–1175.
- Brederson, J.-D., & Honda, C. N. (2015). Primary afferent neurons express functional delta opioid receptors in inflamed skin. *Brain Res*, 1614, 105–111.
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., & Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain*, 10(4), 287–333.
- Brüggemann, J., Galhardo, V., & Apkarian, A. V. (2001). Immediate reorganization of the rat somatosensory thalamus after partial ligation of sciatic nerve. *J Pain*, 2(4), 220–228.
- Budnik, V., Ruiz-Cañada, C., & Wendler, F. (2016). Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 17(3), 160–172.
- Buhler, A. V., Choi, J., Proudfit, H. K., & Gebhart, G. F. (2005). Neurotensin activation of the NTR1 on spinally-projecting serotonergic neurons in the rostral ventromedial medulla is antinociceptive. *Pain*, 114(1-2), 285–294.
- Cahill, C. M., Morinville, A., Hoffert, C., O'Donnell, D., & Beaudet, A. (2003). Up-regulation and trafficking of  $\delta$  opioid receptor in a model of chronic inflammation: Implications for pain control. *Brain Dev*, 25(4), 291–293.
- Cahill, C. M., Morinville, A., Lee, M. C., Vincent, J. P., Collier, B., & Beaudet, A. (2001). Prolonged morphine treatment targets delta opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances delta-mediated antinociception. *J Neurosci*, 21(19), 7598–7607.
- de la Calle Gil, A. B., Peña Vergara, I., Cormane Bornacelly, M. A., & Pajuelo Gallego, A. (2015). Intrathecal ziconotide and morphine for pain relief: A case series of eight patients with refractory cancer pain, including five cases of neuropathic pain. *Neurol Ther*, 4, 159–168.
- Calvino, B. (2007). Les mécanismes de la douleur. *Psycho-oncologie*, 81–87.
- Calvino, B., & Grilo, R. M. (2006). Central pain control. *Joint Bone Spine*, 73, 10–16.

- Carraway, R., Ruane, S. E., & Kim, H. R. (1982). Distribution and immunochemical character of neurotensin-like material in representative vertebrates and invertebrates: Apparent conservation of the COOH-terminal region during evolution. *Peptides*, 1, 115–123.
- Carraway, R., & Leeman, S. E. (1973). The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem*, 248(19), 6854–6861.
- Cavanaugh, D. J., Chesler, A. T., Jackson, A. C., Sigal, Y. M., Yamanaka, H., Grant, R., ... Basbaum, A. I. (2011). Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells, *J Neurosci*, 31(13), 5067–5077.
- Chalaye, P., Goffaux, P., Bourgault, P., Lafrenaye, S., Devroede, G., Watier, A. & Marchand, S. (2012) Comparing pain modulation and autonomic responses in fibromyalgia and irritable bowel syndrome patients. *Clin J Pain*, 28(6), 519–526.
- Chalon, P., Vita, N., Kaghad, M., Guillemot, M., Bonnin, J., Delpech, B., ... Caput, D. (1996). Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett*, 386, 91–94.
- Chandran, P., & Sluka, K. A. (2003). Development of opioid tolerance with repeated transcutaneous electrical nerve stimulation administration. *Pain*, 102(1-2), 195–201.
- Clineschmidt, B.V., & McGuffin, J. C. (1977). Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur J Pharmacol*, 46, 395–396.
- Clineschmidt, B. V., McGuffin, J. C., & Bunting, P. B. (1979). Neurotensin: Antinociceptive action in rodents. *Eur J Pharmacol*, 54(1-2), 129–139.
- Dansereau, M. A., Gosselin, R. D., Pohl, M., Pommierjt, B., Mechighel, P., Mauborgne, A., Rostene, W., Kitabgi, P., Beaudet, N., Sarret, P., & Melik-Parsadaniantzt, S. (2008). Spinal CCL2 pronociceptive action is no longer effective in CCR2 receptor antagonist-treated rats. *J Neurochem*, 106(2), 757–769.
- Delépine, N. (2011) La face cachée des médicaments. Éditions Michalon, Paris, France. 304 pages.
- Díaz-Vera, J., Morales, Y. G., Hernández-Fernaund, J. R., Camacho, M., Montesinos, M. S., Calegari, F., ... Machado, J. D. (2010). Chromogranin B gene ablation reduces the catecholamine cargo and decelerates exocytosis in chromaffin secretory vesicles. *J Neurosci*, 30(3), 950–957.
- D'Mello, R., & Dickenson, A. H. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth*, 101(1), 8–16.

- Dobner, P. R., Barber, D. L., Villa-Komaroff, L., & McKiernan, C. (1987). Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(10), 3516–3520.
- Dobner, P. R. (2006). Neurotensin and pain modulation. *Peptides*, 27(10), 2405–2414.
- Doré-Savard, L., Otis, V., Belleville, K., Lemire, M., Archambault, M., Tremblay, L., Beaudoin, J.-F., Beaudet, N., Lecomte, R., Lepage, M., Gendron, L., & Sarret, P. (2010). Behavioral, medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain. *PLoS One*, 5(10), e13774.
- Doré-Savard, L., Roussy, G., Dansereau, M.-A., Collingwood, M. A., Lennox, K. A., Rose, S. D., Beaudet, N., Behlke, M. A., & Sarret, P. (2008). Central delivery of Dicer-substrate siRNA: A direct application for pain research. *Mol Ther*, 16(7), 1331–1339.
- Doulut S., Rodriguez M., Lugin D., Vecchini F., Kitabgi P., Aumelas A. & Martinez J. (1992) Reduced peptide bond pseudopeptide analogues of neurotensin. *Pept Res*, 5(1), 30-38.
- Dubuc, I., Costentin, J., Terranova, J. P., Barnouin, M. C., Soubrié, P., Le Fur, G., Rostène, W., & Kitabgi, P. (1994). The nonpeptide neurotensin antagonist, SR 48692, used as a tool to reveal putative neurotensin receptor subtypes. *Br J Pharmacol*, 112(2), 352–354.
- Dubuc, I., Sarret, P., Labbé-Jullié, C., Botto, J. M., Honoré, E., Bourdel, E., Martinez, J., Costentin, J., Vincent, J. P., Kitabgi, P., & Mazella, J. (1999a). Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. *J Neurosci*, 19(1), 503–510.
- Dubuc, I., Remande, S., & Costentin, J. (1999b). The partial agonist properties of levocabastine in neurotensin-induced analgesia. *Eur J Pharmacol*, 381(1), 9–12.
- Estelles, A., Sperinde, J., Roulon, T., Aguilar, B., Bonner, C., LePecq, J. B., & Delcayre, A. (2007). Exosome nanovesicles displaying G protein-coupled receptors for drug discovery. *Int J Nanomedicine*, 2(4), 751–760.
- Fan, S. F., Shen, K. F., Scheideler, M. A., & Crain, S. M. (1992). F11 neuroblastoma X DRG neuron hybrid cells express inhibitory  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors which increase voltage-dependent  $K^+$  currents upon activation. *Brain Res*, 590(1-2), 329–333.
- Fantegrossi, W. E., Ko, M. C. H., Woods, J. H., & Richelson, E. (2005). Antinociceptive, hypothermic, hypotensive, and reinforcing effects of a novel neurotensin receptor agonist, NT69L, in rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav*, 80, 341–349.
- Fauré, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., ... Sadoul, R. (2006). Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci*, 31(4), 642–648.



- Feifel, D., Goldenberg, J., Melendez, G., & Shilling, P. D. (2010). The acute and subchronic effects of a brain-penetrating, neurotensin-1 receptor agonist on feeding, body weight and temperature. *Neuropharmacology*, 58(1), 195–198.
- Ferguson, S. S. G. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53(1), 1–24.
- Fields, S. (2005). High-throughput two-hybrid analysis: The promise and the peril. *FEBS J*, 272(21), 5391–5399.
- Fonda, I., Kenig, M., Gaberc-Porekar, V., Pristovaek, P., & Menart, V. (2002). Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor- $\alpha$  drastically changes its properties. *Scientific World J*, 2, 1312–1325.
- Fishman, S., Ballantyne, J. & Rathmell, J. P. (2010). Bonica's management of pain, (4th ed.) Baltimore, MD: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A. S., ... Krämer-Albers, E. M. (2013). Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol*, 11(7), e1001604.
- Furuta, S., Kisara, K., Sakurada, S., Sakurada, T., & Suzuki, K. (1984). Structure-antinociceptive activity studies with neurotensin. *Br J Pharmac*, 83, 43–48.
- Garrison, D. W. & Foreman, R. D. (1994). Decreased activity of spontaneous and noxiously evoked dorsal horn cells during transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). *Pain*, 58(3), 309–315.
- Genc, S., Koroglu, T. F., & Genc, K. (2004). RNA interference in neuroscience. *Mol Brain Res*, 132(2), 260–270.
- Gendron, L., Lucido, A. L., Mennicken, F., O'Donnell, D., Vincent, J. P., Stroh, T., & Beaudet, A. (2006). Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic  $\delta$ -opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci*, 26(3), 953–962.
- Gendron, L., Perron, A., Payet, M. D., Gallo-payet, N., Sarret, P., & Beaudet, A. (2004). Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: Internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Mol Pharmacol*, 66(6), 1421–1430.
- Gomi, H., Morikawa, S., Shinmura, N., Moki, H., Yasui, T., Tsukise, A., ... Hosaka, M. (2015). Expression of secretogranin III in chicken endocrine cells: Its relevance to the secretory granule properties of peptide prohormone processing and bioactive amine content. *J Histochem Cytochem*, 63(5), 350–366.

- Gruenberg, J., & Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(4), 317–323.
- Guan, J. S., Xu, Z. Z., Gao, H., He, S. Q., Ma, G. Q., Sun, T., ... Zhang, X. (2005). Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of  $\delta$ -opioid receptors and opioid analgesia. *Cell*, 122(4), 619–631.
- Guharoy, M., & Chakrabarti, P. (2010). Conserved residue clusters at protein-protein interfaces and their use in binding site identification. *BMC Bioinformatics*, 11, 286.
- Guillemette, A., Dansereau, M. A., Beaudet, N., Richelson, E., & Sarret, P. (2012). Intrathecal administration of NTS1 agonists reverses nociceptive behaviors in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pain*, 16, 473–484.
- Gully, D., Canton, M., Boigegrain, R., Jeanjean, F., Molimard, J. C., Poncelet, M., ... Brouard, A. (1993). Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(1), 65–69.
- Gureje, O., & Korff, M. Von. (1998). Persistent pain and well-being. *JAMA J*, 280(2), 147–152.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. & Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32(1), 77–88.
- Häuser, W., Walitt, B., Fitzcharles, M., & Sommer, C. (2014). Review of pharmacological therapies in fibromyalgia syndrome, *Arthritis Res Ther*, 16(201), 1–10.
- Hendy, G. N., Li, T., Girard, M., Feldstein, R. C., Mulay, S., Desjardins, R., ... Canaff, L. (2006). Targeted ablation of the chromogranin a (Chga) gene: Normal neuroendocrine dense-core secretory granules and increased expression of other granins. *Mol Endocrinol*, 20(8), 1935–1947.
- Hill, S. J. (2006). G-protein-coupled receptors: Past, present and future. *Br J Pharmacol*, 147(S1), S27–S37.
- Hobo, S., Hayashida, K. I., & Eisenach, J. C. (2011). Oxytocin inhibits the membrane depolarization-induced increase in intracellular calcium in capsaicin sensitive sensory neurons: A peripheral mechanism of analgesic action. *Anesth Analg*, 72(2), 181–204.
- Holthuis, J. C., & Martens, G. J. (1996). The neuroendocrine proteins secretogranin II and III are regionally conserved and coordinately expressed with proopiomelanocortin in *Xenopus* intermediate pituitary. *J Neurochem*, 66(6), 2248–2256.

- Holthuis, J. C. M., Jansen, E. J. R., & Martens, G. J. M. (1996). Secretogranin III is a sulfated protein undergoing proteolytic processing in the regulated secretory pathway. *J Biol Chem*, 271(30), 17755–17760.
- Hoppe, A., Christensen, K., & Swanson, J. A. (2002). Fluorescence resonance energy transfer-based stoichiometry in living cells. *Biophys J*, 83(6), 3652–3664.
- Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Uchiyama, Y., & Takeuchi, T. (2002). Identification of a chromogranin A domain that mediates binding to secretogranin III and targeting to secretory granules in pituitary cells and pancreatic B-cells. *Mol Biol Cell*, 13(6), 2001–2015.
- Hosaka, M., Suda, M., Sakai, Y., Izumi, T., Watanabe, T., & Takeuchi, T. (2004). Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J Biol Chem*, 279(5), 3627–3634.
- Hosaka, M., & Watanabe, T. (2010). Secretogranin III: A bridge between core hormone aggregates and the secretory granule membrane. *Endocr J*, 57(4), 275–286.
- Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Kato, T., & Takeuchi, T. (2005). Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. *J Cell Sci*, 118(Pt 20), 4785–4795.
- Hutchings, C. J., Koglin, M., & Marshall, F. H. (2010). Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *MAbs*, 2(6), 594–606.
- Janas, A. M., Sapoń, K., Janas, T., Stowell, M. H. B., & Janas, T. (2016). Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*, 1858(6), 1139–1151.
- Jares-Erijman, E. A., & Jovin, T. M. (2003). FRET imaging. *Nat Biotechnol*, 21(11), 1387–1395.
- Jiang, Y., Oathes, D., Hush, J., Darnall, B., Charvat, M., Mackey, S., & Etkin, A. (2016) Perturbed connectivity of the amygdala and its subregions with the central executive and default mode networks in chronic pain. *Pain*, In press.
- Julien, N., Goffaux, P., Arsenault, P. & Marchand, S. (2005) Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain*, 114(1-2), 295-302.
- Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413, 203–210.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2012) Principles of neural science, 5<sup>th</sup> edition. Elsevier, USA.

- Karpova, T., & McNally, J. G. (2006). Detecting protein-protein interactions with CFP-YFP FRET by acceptor photobleaching. *Curr Protoc Cytom*, Chapitre 12.7.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G., & Emr, S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(12), 893–905.
- Keerthikumar, S., Gangoda, L., Liem, M., Fonseka, P., Atukorala, I., Ozcitti, C., ... Mathivanan, S. (2015). Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget*, 6(17), 15375–15396.
- Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A., & Altevogt, P. (2006). Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*, 107(2), 102–108.
- Kelly, R. B. (1985). Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science*, 230(4721), 25–32.
- Kenakin, T. (2012). Pharmacology in drug discovery: Understanding drug response. Elsevier, USA, 247 pages.
- Kingsley, D. M., Rinchik, E. M., Russell, L. B., Ottiger, H. P., Sutcliffe, J. G., Copeland, N. G., & Jenkins, N. A. (1990). Genetic ablation of a mouse gene expressed specifically in brain. *EMBO J*, 9(2), 395–399.
- Kirchhausen, T. (1999). Adaptators for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 705–732.
- Kitabgi, P. (2006). Differential processing of pro-neurotensin/neuromedin N and relationship to pro-hormone convertases, *Peptides*, 27, 2508–2514.
- de Koninck, Y. (1997). Transmission nerveuse de la douleur : mécanismes endogènes de contrôle au niveau spinal. *Médecine/sciences*, 13, 542–548.
- Kuner, R. (2010). Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med*, 16(11), 1258–1266.
- Labbé-Jullié, C., Dubuc, I., Brouard, A., Doulut, S., Bourdel, E., Pelaprat, D., Mazella, J., Martinez, J., Rostène, W., Costentin, J., & Kitabgi, P. (1994). In vivo and in vitro structure-activity studies with peptide and pseudopeptide neurotensin analogs suggest the existence of distinct central neurotensin receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, 268(1), 328–336.
- Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F. J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y., & Sadoul, R. (2011). Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci*, 46(2), 409–418.

- Lafrance, M., Roussy, G., Belleville, K., Maeno, H., Beaudet, N., Wada, K., & Sarret, P. (2010). Involvement of NTS2 receptors in stress-induced analgesia. *Neuroscience*, 166(2), 639–652.
- Lakkaraju, A., & Enrique, R.-B. (2008). Itinerant exosomes: Emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol*, 18(5), 199-209.
- Larner, D. (2013). Chronic pain transition: A concept analysis. *Pain Manag Nurs*, 15(3), 707–717.
- Lavis J. N., & Boyko J. A. (2009). Evidence Brief: Supporting chronic pain management across provincial and territorial health systems in Canada. Hamilton, Canada: McMaster Health Forum.
- Lemire, M. (2013) Étude de l'interaction fonctionnelle du récepteur NTS2 avec la sécrétogranine III. Mémoire, Université de Sherbrooke.
- Li, X. B., Zhang, Z. R., Schluesener, H. J., & Xu, S. Q. (2006). Role of exosomes in immune regulation. *J Cell Mol Med*, 10(2), 364–375.
- Liang, B., Peng, P., Chen, S., Li, L., Zhang, M., Cao, D., ... Shen, K. (2013). Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes. *J Proteomics*, 80, 171–182.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lobb, R. J., Becker, M., Wen, S. W., Wong, C. S. F., Wiegman, A. P., Leimgruber, A., & Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles*, 1(27031), 1–11.
- Loeser, J. D., & Melzack, R. (1999). Pain: An overview. *The Lancet*, 353(9164), 1607–1609.
- Loh, Y. P., Maldonado, A., Zhang, C., Tam, W. H., & Cawley, N. (2002). Mechanism of sorting proopiomelanocortin and proenkephalin to the regulated secretory pathway of neuroendocrine cells. *Ann N.Y. Acad Sci*, 971, 416–425.
- Lynch, M. E., & Watson, C. P. N. (2006). The pharmacotherapy of chronic pain: A review. *Pain Res Manag*, 11(1), 11–38.
- Maeno, H., Yamada, K., Santo-yamada, Y., Aoki, K., & Sun, Y. (2004). Comparison of mice deficient in the high- or low-affinity neurotensin receptors, Ntsr1 or Ntsr2, reveals a novel function for Ntsr2 in thermal nociception. *Brain Res*, 998, 122–129.
- Mai, J. K., Triepel, J., & Metz, J. (1987). Neurotensin in the human brain. *Neuroscience*, 22(2), 499–524.

- Marchand, S., Li, J., & Charest, J. (1995). Effects of caffeine on analgesia from transcutaneous electrical nerve stimulation. *Am Fam Physician*, 52(1), 319–327.
- Marks, M. S., Ohno, H., Kirchhausen, T., & Bonifacino, J. S. (1997). Protein sorting by tyrosine-based signals: Adapting to the Ys and wherefores. *Trends Cell Biol*, 7(3), 124–128.
- Martin, S., Vincent, J.-P., & Mazella, J. (2002). Recycling ability of the mouse and the human neurotensin type 2 receptors depends on a single tyrosine residue. *J Cell Sci*, 115(Pt 1), 165–173.
- Mazella, J., Botto, J., Guillemare, E., Coppola, T., Sarret, P., & Vincent, J. (1996). Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain, *J Neurosci*, 16(18), 5613–5620.
- Mazella, J., & Vincent, J. P. (2006). Functional roles of the NTS2 and NTS3 receptors. *Peptides*, 27(10), 2469–2475.
- Mazella, J., Zsürger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., ... Vincent, J. P. (1998). The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 273(41), 26273–26276.
- Meldolesi, J., Chiergatti, E., & Malosio, M. L. (2004). Requirements for the identification of dense-core granules. *Trends Cell Biol*, 14(1), 13–19.
- Melzack, R., & Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: A new theory. *Science*, 150(3699), 971-979.
- Menétrey, D., Gannon, A., Levine, J.D. & Basbaum, A.I. (1989) Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular, and visceral stimulation. *J Comp Neurol*, 285(2), 177-195.
- Meyr, A. J., & Saffran, B. (2008). The pathophysiology of the chronic pain cycle. *Clin Podiatr Med Surg*, 25(3), 327–346.
- Mika, J., Przewlocki, R., & Przewlocka, B. (2001). The role of delta-opioid receptor subtypes in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 415(1), 31–37.
- Morel, L., Regan, M., Higashimori, H., Kah Ng, S., Esau, C., Vidensky, S., Rothstein, J. & Yang, Y. (2013) Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1. *J Biol Chem*, 288, 7105–7116.
- Moulin, D. E., Clark, A. J., Speechley, M., & Morley-Forster, P. K. (2002). Chronic pain in Canada: Prevalence, treatment, impact and the role of opioid analgesia. *Pain Res Manag*, 7(4), 179–184.

- Mukerjee, D., Nissen, S. E., & Topol, E. J. (2001) Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA*, 286(8), 954-959.
- Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*, 3, 1–14.
- Mutso, A. A., Radzicki, D., Baliki, M. N., Huang, L., Banisadr, G., ... & Apkarian, A. V. (2012). Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. *J Neurosci*, 32(17), 5747-5756.
- Nagy, I., Santha, P., Jancso, G., & Urban, L. (2004). The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur J Pharmacol*, 500, 351–369.
- Nouel, D., Sarret, P., Vincent, J., Mazella, J., & Beaudet, A. (1999). Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors. *Neuroscience*, 94(4), 1189–1197.
- Osadchii, O. E. (2015). Emerging role of neurotensin in regulation of the cardiovascular system. *Eur J Pharmacol*, 762, 184–192.
- Ottiger, H. P., Battenberg, E. F., Tsou, A. P., Bloom, F. E., & Sutcliffe, J. G. (1990). 1B1075: A brain- and pituitary-specific mRNA that encodes a novel chromogranin/secretogranin-like component of intracellular vesicles. *J Neurosci*, 10(9), 3135–3147.
- Pandey, K. N. (2009). Functional roles of short sequence motifs in the endocytosis of membrane receptors. *Front Biosci*, 14(1), 5339.
- Parent, A. J., Têtreault, P., Roux, M., Belleville, K., Longpré, J. M., Beaudet, N., ... & Sarret, P. (2016). Descending nociceptive inhibition is modulated in a time-dependent manner in a double-hit model of chronic/tonic pain. *Neuroscience*, 315, 70–78.
- Parent, A. J., Beaudet, N., Beaudry, H., Bergeron, J., Bérubé, P., Drolet, G., Sarret, P., & Gendron, L. (2012). Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. *Behav Brain Res*, 229(1), 160–167.
- Parent, A. J., Beaudet, N., Daigle, K., Sabbagh, R., Sansoucy, Y., Marchand, S., ... Goffaux, P. (2015). Relationship between blood- and cerebrospinal fluid-bound neurotransmitter concentrations and conditioned pain modulation in pain-free and chronic pain subjects. *J Pain*, 16(5), 436–444.
- Parent, J. L., & Binda, C. (2015). Characterization of the interaction between the prostaglandin D<sub>2</sub> DP1 receptor and the intracellular L-prostaglandin D synthase. *Methods Mol Biol*, 1234.

- Parkoohi, P. I., Amirzadeh, K., Mohabbati, V., & Abdollahifard, G. (2015). Satisfaction with chronic pain treatment. *Anesth Pain Med*, 5(4), e23528.
- Pelaprat, D. (2006). Interactions between neurotensin receptors and G proteins. *Peptides*, 27(10), 2476–2487.
- Perron, A., Sarret, P., Gendron, L., Stroh, T., & Beaudet, A. (2005). Identification and functional characterization of a 5-transmembrane domain variant isoform of the NTS2 neurotensin receptor in rat central nervous system. *J Biol Chem*, 280(11), 10219–10227.
- Perron, A., Sharif, N., Gendron, L., Lavallée, M., Stroh, T., Mazella, J., & Beaudet, A. (2006). Sustained neurotensin exposure promotes cell surface recruitment of NTS2 receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 343(3), 799–808.
- Petrie, K. A., Bubser, M., Casey, C. D., Davis, M. D., Roth, B. L., & Deutch, A. Y. (2004). The neurotensin agonist PD149163 increases Fos expression in the prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology*, 29(10), 1878–1888.
- Pettibone, D. J., Hess, J. F., Hey, P. J., Jacobson, M. A., Leviten, M., Lis, E. V., ... Zeng, Z. (2002). The effects of deleting the mouse neurotensin receptor NTR1 on central and peripheral responses to neurotensin. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(1), 305–313.
- Phillips, C. J. & Schopflocher, D. (2008) “The Economics of Chronic Pain” in Health Policy Perspectives on Chronic Pain. S. Rashiq, P. Taenzer and D. Schopflocher. UK, Wiley Press.
- Platika, D., Boulos, M. H., Baizer, L., & Fishman, M. C. (1985). Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 3499–3503.
- Ponnambalam, S., & Baldwin, S. A. (2003). Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Mol Membr Biol*, 20(2), 129–139.
- Popp, E., Schneider, A., Vogel, P., Teschendorf, P., & Bo, B. W. (2007). Time course of the hypothermic response to continuously administered neurotensin. *Neuropeptides*, 41, 349–354.
- Pospichalova, V., Svoboda, J., Dave, Z., Kotrbova, A., Kaiser, K., Klemova, D., ... Bryja, V. (2015). Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer. *J Extracell Vesicles*, 4, 25530.
- Prange, A. J. (1982). The manifold actions of neurotensin, a first synthesis. *Ann NY Acad Sci*, 668, 298–306.



- Puretic, M. B., & Demarin, V. (2012). Neuroplasticity mechanisms in the pathophysiology of chronic pain. *Acta Clin Croat*, 51(2), 425–429.
- Quinones, M., Urrutia, R., Torres-Reveron, A., Vincent, K. & Flores, I. (2015). Anxiety, coping skills and hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis in patients with endometriosis. *J Reprod Biol Health*, 3, 229-262.
- Rang, H. P., Dale., M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2013). Pharmacology. Elsevier, USA, 777 pages.
- Reinecke, M. (1985) Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone. *Prog Histochem Cytochem*, 16(1), 1-172.
- Remaury, A., Vita, N., Gendreau, S., Jung, M., Arnone, M., Poncelet, M., ... & Ferrara, P. (2002). Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res*, 953(1-2), 63–72.
- Richard, F., Barroso, S., Martinez, J., Labbe-Jullié, C., & Kitabgi P. (2001). Agonism, inverse agonism, and neutral antagonism at the constitutively active human neurotensin receptor 2. *Mol Pharmacol*, 60, 1392–1398.
- Rong, Y-P., Liu, F., Zeng, L-C., MA, W-J., WEI, D-Z. & Han, Z-G. (2002) Cloning and Characterization of a Novel Human Secretory Protein: Secretogranin III. *Acta Biochim Biophys Sin*, 34(4), 411-417.
- Rostène, W. H., & Alexander, M. J. (1997). Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol*, 18, 115–173.
- Roussy, G., Beaudry, H., Lafrance, M., Belleville, K., Beaudet, N., Wada, K., Gendron, L., & Sarret, P. (2010). Altered morphine-induced analgesia in neurotensin type 1 receptor null mice. *Neuroscience*, 170(4), 193-197.
- Roussy, G., Dansereau, M. A., Doré-Savard, L., Belleville, K., Beaudet, N., Richelson, E., & Sarret, P. (2008). Spinal NTS1 receptors regulate nociceptive signaling in a rat formalin tonic pain model. *J Neurochem*, 105(4), 1100–1114.
- Roussy, G., Dansereau, M.-A., Baudisson, S., Ezzoubaa, F., Belleville, K., Beaudet, N., Martinez, J., Richelson, E., & Sarret, P. (2009). Evidence for a role of NTS2 receptors in the modulation of tonic pain sensitivity. *Mol Pain*, 5(38).
- Sakai, Y., Hosaka, M., Yoshinaga, A., Hira, Y., Harumi, T., & Watanabe, T. (2004). Immunocytochemical localization of secretogranin III in the endocrine pancreas of male rats. *Arch Histol Cytol*, 67(1), 57-64.

- Sarret, P., Esdaile, M. J., Perron, A., Martinez, J., Stroh, T., & Beaudet, A. (2005). Potent spinal analgesia elicited through stimulation of NTS2 neurotensin receptors. *J Neurosci*, 25(36), 8188–8196.
- Sarret, P., Esdaile, M. J., McPherson, P. S., Schonbrunn, A., Kreienkamp, H. J., & Beaudet, A. (2004). Role of amphiphysin II in somatostatin receptor trafficking in neuroendocrine cells. *J Biol Chem*, 279(9), 8029–8037.
- Sarret, P., Gendron, L., Kilian, P., Gallo-Payet, N., Payet, M. D., & Beaudet, A. (2002). Pharmacology and functional properties of NTS2 neurotensin receptors in cerebellar granule cells. *J Biol Chem*, 277(39), 36233–36243.
- Sarret, P., Perron, A., Stroh, T., & Beaudet, A. (2003). Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 461(4), 520–538.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Albert, C. (2012). Fiji: An open source platform for biological image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676–682.
- Schopflocher, D., Taenzer, P., & Jovey, R. (2011). The prevalence of chronic pain in Canada. *Pain Res Manage*, 16(6), 445–450.
- Schotte, A., Leysen, J. E. & Laduron, P. M. (1986) Evidence for a displaceable non-specific [3H]neurotensin binding site in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 333(4), 400-405.
- Scroggs, R. S., & Fox, A. P. (1992). Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J Physiol*, 445, 639–658.
- Skogberg, G., Gudmundsdottir, J., van der Post, S., Sandström, K., Bruhn, S., Benson, M., ... Ekwall, O. (2013). Characterization of Human Thymic Exosomes. *PLoS One*, 8(7), 1–10.
- Slusher, B.S., Zacco, A.E., Maslanski, J.A., Norris, T.E., McLane, M.W., Moore, W.C., Rogers, N.E. & Ignarro, L.J. (1994) The cloned neurotensin receptor mediates cyclic GMP formation when coexpressed with nitric oxide synthase cDNA. *Mol Pharmacol*, 46(1), 115-121.
- Smith, K. E., Boules, M., Williams, K., & Richelson, E. (2012). NTS1 and NTS2 mediate analgesia following neurotensin analog treatment in a mouse model for visceral pain. *Behav Brain Res*, 232(1), 93–97.
- Sun, M., Watanabe, T., Bochimoto, H., Sakai, Y., Torii, S., Takeuchi, T., & Hosaka, M. (2013). Multiple sorting systems for secretory granules ensure the regulated secretion of peptide hormones. *Traffic*, 14(2), 205–218.

- Swanton, E., & Bulleid, N. J. (2003). Protein folding and translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Membr Biol*, 20(2), 99–104.
- Szasz, J., Yaffe, M. B., Elzinga, M., Blank, G. S. & Sternlicht, H. (1986). Microtubule assembly is dependant on a cluster of basic residues in alpha-tubulin. *Biochemistry*, 26(16), 4572-4582.
- Tanaka, K., Masu, M., & Nakanishi, S. (1990). Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor, *Neuron*, 4, 847–854.
- Tang, N.K.Y. & Crane, C. (2006) Suicidality in chronic pain: A review of the prevalence, risk factors and psychological links. *Psychol Med*, 36(5), 575-586.
- Taupenot, L., Harper, K. L., & O'Connor, D. (2003). The chromogranin–secretogranin family. *N Engl J Med*, 348, 1134-1149.
- Tétreault, P., Beaudet, N., Perron, A., Belleville, K., René, A., Cavelier, F., ... Sarret, P. (2013). Spinal NTS2 receptor activation reverses signs of neuropathic pain. *FASEB J*, 27(9), 3741–3752.
- Tétreault, P., Dansereau, M. A., Doré-Savard, L., Beaudet, N., & Sarret, P. (2011). Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiol Behav*, 104(3), 495–502.
- Thébaud, B., & Stewart, D. J. (2012). Exosomes: Cell garbage can, therapeutic carrier, or trojan horse? *Circulation*, 126(22), 2553–2555.
- Thermo Scientific Pierce Protein Biology (2011). Protein interactions. *Piercenet*, 15–17.
- Théry, C., Clayton, A., Amigorena, S. & Raposo, G. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapitre 3, Unité 3.22.
- Thiele, C., Gerdes, H. H., & Huttner, W. B. (1997). Protein secretion: Puzzling receptors. *Curr Biol*, 7(8), R496–500.
- Tian, X., Kang, D. S., & Benovic, J. L. (2014).  $\beta$ -Arrestins and G protein-coupled receptor trafficking. *Handb Exp Pharmacol*, 219, 173-186.
- Toblin, R. L., MacK, K. A., Perveen, G., & Paulozzi, L. J. (2011). A population-based survey of chronic pain and its treatment with prescription drugs. *Pain*, 152(6), 1249–1255.
- Toomre, D., Steyer, J. A., Keller, P., Almers, W., & Simons, K. (2000). Fusion of constitutive membrane traffic with the cell surface observed by evanescent wave microscopy. *J Cell Biol*, 149(1), 33–40.

- Tooze, S. A., Martens, G. J. M., & Huttner, W. B. (2001). Secretory granule biogenesis: Rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol*, 11(3), 116–122.
- Toussaint, B. (dir.) et collaborateurs. (2011). Petit manuel de pharmacovigilance et pharmacologie clinique. La revue Prescrire, Parie, France.
- Turner, J. T., James-Kracke, M. R., & Camden, J. M. (1990). Regulation of the neurotensin receptor and intracellular calcium mobilization in HT29 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 253(3), 1049–1056.
- Tyler, B. M., Douglas, C. L., Fauq, A., Pang, Y. P., Stewart, J. A., Cusack, B., McCormick, D. J., & Richelson, E. (1999). In vitro binding and CNS effects of novel neurotensin agonists that cross the blood-brain barrier. *Neuropharmacology*, 38(7), 1027–1034.
- Tyler-McMahon, B. M., Boules, M., & Richelson, E. (2000). Neurotensin: Peptide for the next millennium. *Regul Pept*, 93(1-3), 125–136.
- Urbé, S., Page, L. J., & Tooze, S. A. (1998). Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation in a cell-free assay. *J Cell Biol*, 143(7), 1831–1844.
- Ussai, S., Miceli, L., Pisa, F. E., Bednarova, R., Giordano, A., Della Rocca, G., & Petelin, R. (2015). Impact of potential inappropriate NSAIDs use in chronic pain. *Drug Des Devel Ther*, 9, 2073–2077.
- Vachon-Presseau, E., Tétreault, P., Petre, B., Huang, L., Berger, S. E., Torbey, S., ... & Apkarian, A. V. (2016) Corticolimbic anatomical characteristics predetermine risk for chronic pain. *Brain*, 139(7), 1958–1970.
- Vachon-Presseau, E., Centeno, M. V., Ren, W., Berger, S. E., Tétreault, P., ... & Apkarian, A. V. (2016) The emotionnal brain as a predictor and amplifier of chronic pain. *J Dent Res*, 95(6), 605–612.
- Valeant Canada limitée et collaborateurs. *Pain explained: Pain pathways and medications*. <http://www.viha.ca/nr/rdonlyres/33207b57-4aac-4f05-a273-5f53d7c4ffb1/0/painexplained.pdf>, page consultée en avril 2014.
- Van Steenwinckel, J., Reaux-Le Goazigo, A., Pommier, B., Mauborgne, A., Dansereau, M.-A., Kitabgi, P., Sarret, P., Pohl, M., & Mélik Parsadaniantz, S. (2011). CCL2 released from neuronal synaptic vesicles in the spinal cord is a major mediator of local inflammation and pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci*, 31(15), 5865–5875.
- Vázquez-Martínez, R., Díaz-Ruiz, A., Almaguade, F., Rabanal-Ruiz, Y., Gracia-Navarro, F., & Malagón, M. M. (2012). Revisiting the regulated secretory pathway: From frogs to human. *Gen Comp Endocrinol*, 175(1), 1–9.

- Vincent, J. P., Mazella, J., & Kitabgi, P. (1999). Neurotensin and neurotensin receptors. *Encycl Neurosci*, 20, 1021–1034.
- Vita, N., Laurent, P., Lefort, S., Chalon, P., Dumont, X., Kaghad, M., Gully, D., Le Fur, G., Ferrara, P., & Caput, D. (1993). Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett*, 317(1-2), 139-142.
- Vita, N., Oury-Donat, F., Chalon, P., Guillemot, M., Kaghad, M., Bachy, A. ... Caput, D., & Ferrara, P. (1998). Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Pharmacol*, 360(2-3), 265-272.
- Walker, N., Lepee-Lorgeoux, I., Fournier, J., Betancur, C., Rostene, W., Ferrara, P., & Caput, D. (1998). Tissue distribution and cellular localization of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor mRNA in adult rat brain. *Mol Brain Res*, 57, 193–200.
- Wang, J., Silva, M., Haas, L., Morsci, N., Nguyen, K. C. Q., Hall, D. H., & Barr, M. M. (2014). *C. elegans* ciliated sensory neurons release extracellular vesicles that function in animal communication. *Curr Biol*, 24(5), 519-525.
- Wasmeier, C., Bright, N. A., & Hutton, J. C. (2002). The luminal domain of the integral membrane protein phogrin mediates targeting to secretory granules. *Traffic*, 3(9), 654–665.
- Willis, W. D. (1985). Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 308, 253–270.
- Wise, A., Steven, C. J., & Rees, S. (2004). The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annu Rev Environ Resour*, 28(1), 205–241.
- Wollert, T., & Hurley, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 464(7290), 864–869.
- Wustrow, D. J., Davis, M. D., Akunne, H. C., Corbin, A. E., Wiley, J. N., Wise, L. D., & Heffner, T. G. (1995) Reduced amide bond neurotensin 8-13 mimetics with potent in vivo activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 5(9), 997–1002.
- Yamada, M., Lombet, A., Forgez, P., & Rostene, W. (1998). Distinct functional characteristics of levocabastine sensitive rat neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Life Sci*, 62, 375–380.
- Zhang, X., & Bao, L. (2012). Interaction and regulatory functions of  $\mu$ -And  $\delta$ -opioid receptors in nociceptive afferent neurons. *Neurosci Bull*, 28(2), 121–130.
- Zhang, X., Bao, L., & Ma, G. Q. (2010). Sorting of neuropeptides and neuropeptide receptors into secretory pathways. *Prog Neurobiol*, 90(2), 276–283.

- Zhao, B., Wang, H.-B., Lu, Y.-J., Hu, J.-W., Bao, L., & Zhang, X. (2011). Transport of receptors, receptor signaling complexes and ion channels via neuropeptide-secretory vesicles. *Cell Res*, 21(5), 741–53.
- Zinchuk, V., & Grossenbacher-Zinchuk, O. (2009). Recent advances in quantitative colocalization analysis: Focus on neuroscience. *Prog Histochem Cytochem*, 44(3), 125–172.
- Zsürger, N. (2001) Les récepteurs de la neurotensine chez les mammifères : caractérisation, purification, ontogenèse et vieillissement. Thèse, Nice-Sophia Antipolis.